

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ**

**ESTUDO QUÍMICO E DAS ATIVIDADES BIOLÓGICAS DOS  
ALCALÓIDES INDÓLICOS DE *Himatanthus lancifolius* (Muell. Arg.)  
Woodson, APOCYNACEAE – (Agoniada)**

CURITIBA  
2008

**WESLEY MAURICIO DE SOUZA**

**ESTUDO QUÍMICO E DAS ATIVIDADES BIOLÓGICAS DOS  
ALCALÓIDES INDÓLICOS DE *Himatanthus lancifolius* (Muell. Arg.)  
Woodson, APOCYNACEAE – (Agoniada)**

Tese apresentada como requisito parcial à  
obtenção do grau de Doutor, pelo Programa de  
Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas, do  
Setor de Ciências da Saúde, da Universidade  
Federal do Paraná.

Orientador: Prof. Tit. Cid Aimbiré de M. Santos.

CURITIBA  
2008

## NOTA BIOGRÁFICA

---

O autor graduou-se em Farmácia Bioquímica pela Universidade Federal do Paraná em 1998, tendo sido Farmacêutico plantonista no Laboratório GR de Análises Clínicas e Toxicológicas nesse mesmo ano, paralelamente concluindo as disciplinas de habilitação em Indústria. Em 2000, iniciou o curso de Mestrado no Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal do Paraná, área de Produtos Naturais, e assumiu a cadeira de Microbiologia básica e dos Alimentos na Universidade Campus de Andrade (Uniandrade) para cursos da Ciência da Saúde e Farmacognosia I, II e Fitoquímica pela Universidade Tuiuti do Paraná (UTP) para o curso de Farmácia, no qual permanece como Professor Adjunto. Atualmente também é professor da disciplina de Toxicologia dos Produtos Naturais no Curso de Especialização em Toxicologia do Instituto de Ensino Superior Pequeno Príncipe (IESPP). No ano de 2003, retornou ao Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas, área de produtos naturais, nível doutorado, onde desenvolveu pesquisa sobre as cascas de *Himatanthus lancifolius*, sendo os resultados apresentados nessa tese e foram, em parte, publicados conforme abaixo:

- Souza, WM; Stinghen, AEM; Santos, CAM. **Antimicrobial activity of alkaloidal fraction from barks of *Himatanthus lancifolius* (Muell. Arg.) Woodson, Apocynaceae.** *Fitoterapia* 75(7-8):750-753, 2004 (Página 146).
- Rattmann, YD; Terluk, MR; Souza, WM; Santos, CAM; Biavatti, MW; Torres, LB; Vela, SM; Rieck, L; Santos, JES; Marques, MCA. **Effects of alkaloids of *Himatanthus lancifolius* (Muell. Arg.) Woodson, Apocynaceae, on smooth muscle responsiveness.** *J. Ethnopharmacol.* 100(3):268-275, 2005 (Página 147).
- Baggio, CH; Otofui, G; Torres, LB; Rieck, L; Santos, CAM; Souza, WM; Marques, MCA; Vela, SM. **Gastroprotective mechanisms of Indole Alkaloids from *Himatanthus lancifolius* (Muell. Arg.) Woodson.** *Planta Med.* 71(8):733-738, 2005 (Página 148).
- Souza, WM; Santos, CAM; Weffort-Santos, AM. **Uleine inhibits human leukocyte chemotaxis.** *Braz. J. Pharm. Sci.* 41(sup):259, 2005 (Página 149).
- Souza, WM; Brehmer, F; Nakao, LS; Stinghen, AEM; Santos, CAM. **Ação da uleína sobre a produção de óxido nítrico em células RAEC e B16F10.** *Rev. Bras. Farmacognosia* 17(2): 191-196, 2007 (Página 150).
- Nardin JM; Souza, WM; Lopes, JF; Florão, A; Santos, CAM; Weffort-Santos, AM. **Effects of *Himatanthus lancifolius* on Human Leukocyte Chemotaxis and Their Adhesion to Integrins.** *Planta Médica.* Aceito para publicação, 2008.
- Souza, WM; Getz, J; Yared, L; Santos, CAM; Nakao, LS; Stinghen, AEM. **Preliminary evaluation of uleine in cellular adhesion of B16F-10 melanoma cells and its antimicrobial activity.** *Fitoterapia*, submetido (Página 151).

## DEDICATÓRIA

---

*Aos meus queridos pais, Agostinho e Maria Teresinha e a minha esposa Andréa, três anjos inesquecíveis.*

## AGRADECIMENTOS

---

Ao Prof. Tit. Cid Aimbiré de Moraes Santos pela amizade, dedicação, competência e liderança demonstrados diariamente.

À Profa. Almeriane Weffort Santos pela seriedade e sensatez apresentadas durante a elaboração das etapas do trabalho.

A todos os colegas do laboratório de Farmacognosia, sem distinção, pelo convívio e alegrias compartilhadas e em especial, a Sra. Maria do Rocio Baldon Reis pelo auxílio durante a realização experimental, sempre disposta a ajudar e pela tolerância à bagunça.

Ao Prof. Aguinaldo Nascimento pelo auxílio nos estudos estatísticos.

Ao Departamento de Bioquímica da UFPR, na pessoa dos meus grandes amigos Sergio Ascêncio e Ricardo Wagner, pela indispensável cooperação na obtenção dos espectros de CG-EM e RMN.

À Profa. Lia Sumie Nakao, por ter aberto as portas de seu laboratório e ter me dado à oportunidade do complemento desse trabalho.

Ao meu irmão Anderson Rodrigo e esposa, pelo incentivo durante a elaboração desse trabalho.

Ao meu querido sobrinho Derek Anderson, por ser uma luz e fonte de harmonia familiar.

A minha querida Andréa E. Marques Stinghen pelo apoio incondicional, amor e compreensão pelas ausências.

Para que esse trabalho fosse realizado, diversas pessoas não citadas acima contribuíram direta ou indiretamente, sendo que não me é possível citá-las nominalmente. A elas, meus mais profundos agradecimentos.

E sem dúvida, ao Deus eterno, pela vida e oportunidade concedida.

## EPÍGRAFE

---

*Pois nada há encoberto que não haja de ser manifesto, e nada se faz para ficar oculto, mas para ser descoberto.*  
**Marcos 4:22**

# SUMÁRIO

---

<b>NOTA BIOGRÁFICA</b> .....	iii
<b>DEDICATÓRIA</b> .....	iv
<b>AGRADECIMENTOS</b> .....	v
<b>EPIGRAFE</b> .....	vi
<b>LISTA DE ABREVIATURA, SIMBOLOS E SIGLAS</b> .....	x
<b>LISTA DE FIGURAS</b> .....	xiv
<b>LISTA DE TABELAS</b> .....	xvii
<b>LISTA DE ESQUEMA</b> .....	xix
<b>RESUMO</b> .....	xx
<b>ABSTRACTS</b> .....	xxi
<b>INTRODUÇÃO</b> .....	1
CONSIDERAÇÕES GERAIS.....	6
POSIÇÃO SISTEMÁTICA DA ESPÉCIE.....	6
DIFERENCIAÇÃO DO GÊNERO <i>Himatanthus</i> e <i>Plumeria</i> .....	6
DESCRIÇÃO BOTÂNICA.....	7
PRODUTOS DO METABÓLISMO SECUNDÁRIO.....	10
Derivados do ácido chiquímico.....	12
Alcalóides derivados do triptofano.....	15
Alcalóides indólicos.....	17
Classificação.....	17
Biogênese.....	20
REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	22
Constituição química, atividade farmacológica e uso popular do gênero <i>Himatanthus/Plumeria</i> .....	22
METÁSTASE.....	30
INFLAMAÇÃO E RESPOSTA INFLAMATÓRIA.....	32
Quimiotaxia leucocitária.....	35
ÓXIDO NÍTRICO.....	36
Síntese e inibição.....	38
NO produzido pela e-NOS.....	40
NO produzido pela i-NOS.....	42
<b>OBJETIVOS</b> .....	44
OBJETIVOS GERAIS.....	44
OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	44
<b>EXPERIMENTAL</b> .....	45
MATERIAL BOTÂNICO.....	45
TRIAGEM FITOQUÍMICA.....	46
MÉTODOS ESPECTROMÉTRICOS E CROMATOGRÁFICOS.....	46
ISOLAMENTO QUÍMICO.....	48
Extração de alcalóides - Método A.....	48
Fracionamento e isolamento de alcalóides.....	50
Purificação dos alcalóides isolados.....	52
Extração de substâncias – Método B.....	52
Hidrólise da substância B1.....	54

Redução.....	54
Acetilação.....	54
Análise por CG-EM e RMN <sup>13</sup> C.....	55
ENSAIOS FARMACOLÓGICOS.....	55
ENSAIOS BIOLÓGICOS <i>IN VIVO</i> .....	56
Toxicidade aguda da FAA e substâncias isoladas.....	56
ATIVIDADE ANTIOXIDANTE.....	56
Preparação dos extratos.....	56
Avaliação da atividade pela formação do complexo fosfomolibdênico.....	57
Ensaio fotométrico com DPPH.....	57
Interpolação polinomial de Lagrange.....	58
MIGRAÇÃO LEUCOCITÁRIA <i>IN VITRO</i> .....	59
Obtenção de leucócitos humanos.....	59
Isolamento de leucócitos humanos.....	60
Viabilidade e citotoxicidade celulares.....	60
Substâncias isoladas como agentes quimioatratores.....	61
Migração leucocitária <i>in vitro</i> (Quimiotaxia).....	61
MIGRAÇÃO LEUCOCITÁRIA <i>IN VIVO</i> INDUZIDA POR CARRAGENINA.....	62
Animais.....	62
Avaliação da potencia antiinflamatória.....	63
BIOENSAIO ANTIMICROBIANO.....	63
DOSAGEM DE ÓXIDO NÍTRICO.....	64
Linhagens celulares.....	64
Cultura celular.....	65
Viabilidade e citotoxicidade celulares.....	65
Substâncias isoladas.....	65
Dosagem.....	65
TESTE DE ADESÃO CELULAR.....	66
Linhagens celulares.....	66
Cultivo celular.....	66
Avaliação da adesão celular <i>in vitro</i> .....	67
ANÁLISES ESTATÍSTICAS.....	68
<b>RESULTADOS E DISCUSSÕES.....</b>	<b>69</b>
ABORDAGEM FITOQUÍMICA.....	69
ALCALÓIDES ISOLADOS.....	72
SUBSTÂNCIA AL1.....	72
SUBSTÂNCIA AL2.....	80
SUBSTÂNCIA AL3.....	80
SUBSTÂNCIA B1.....	82
ATIVIDADE FARMACOLÓGICA.....	84
Ensaio biológicos <i>in vivo</i> .....	84
ATIVIDADE ANTIOXIDANTE.....	84
Ensaio da redução do complexo fosfomolibdênico.....	85
Ensaio da redução do radical livre DPPH.....	88
QUIMIOTAXIA LEUCOCITÁRIA.....	95
Teste de toxicidade.....	95
Teste para verificação da uleína como agente quimioatrator.....	96
Influência da uleína na quimiotaxia leucocitária.....	98



Estudo do mecanismo de ação da uleína sobre a quimiotaxia.....	<b>101</b>
TESTE DA PERITONITE INDUZIDA PELA CARRAGENINA.....	<b>106</b>
ENSAIO ANTIMICROBIANO.....	<b>109</b>
TESTE DE ADESÃO CELULAR.....	<b>114</b>
PRODUÇÃO DE ÓXIDO NÍTRICO.....	<b>119</b>
<b>CONCLUSÕES.....</b>	<b>125</b>
<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....</b>	<b>127</b>
<b>ANEXOS.....</b>	<b>143</b>

## LISTA DE ABREVIATURA, SIGLAS E SIMBOLOS

---

AAR <sub>%</sub>	atividade antioxidante relativa
Abs	absorvância
Ac <sub>2</sub> O	anidrido acético
AL1	uleína
AL2	ioimbina
AL3	<i>epi</i> -uleína
B1	sacarose
B16F10	células melanoma de camundongos
<sup>13</sup> C	isótopo de carbono-13
CC	cromatografia em coluna
CCD	cromatografia em camada delgada
CG-EM	cromatografia gasosa acoplada em detector massa
CI	“Chemical ionization”
COSY	COrelated SpectroscopY
<i>d</i>	duplete
D <sub>2</sub> O	água deuterada
DEXA	dexametasona
DMSO	dimetilsulfóxido
DPPH	1,1-difenil-2-picrilhidrazila
EAL	extrato alcalinizado
EBA	extrato bruto aquoso
EDRF	fator relaxamento derivado endotélio
EI	“Energy ionization”
EM	espectro de massas
EPM	erro padrão da média
FAA	fração de alcalóides da agoniada
FC	fração cloroformica
f.m	fase móvel
fMLP	N-formil-metionil-leucil-fenilalanina
g	grama
GMPc	guanosina monofosfato ciclica
h	h
HPLC	high performance liquid chromatography

IC	concentração inibitória
IC <sub>50</sub>	concentração inibitória média
IL	interleucina
IR	infravermelho
IUPAC	“International Union of Pure and Applied Chemistry”
kg	quilograma
l	litro
LPS	lipopolissacarídeo
LTB <sub>4</sub>	leucotrieno B <sub>4</sub>
m	metros
M <sup>+</sup>	íon molecular
MCP <sub>1</sub>	proteína quimiotractora de monócitos-1
NHA	N-hidroxi-L-arginina
NO	óxido nítrico
min	minuto
<i>m/z</i>	massa do íon
NOS	óxido nítrico sintase
<sup>1</sup> H	próton
RMN <sup>1</sup> H	ressonância nuclear magnética de protons
RMN <sup>13</sup> C	ressonância nuclear magnética de carbono-13
nm	nanômetro
NO	óxido nítrico
PA	pressão arterial
PBS	phosphate buffered saline
PMN	polimorfonucleares
ppm	partes por milhão
<i>q.s.p</i>	quantidade suficiente para
RAEC	células endoteliais de aorta de coelho
RANTES	proteína atractora seletiva para linfócitos T e monócitos
ROS	espécies reativas de oxigeno
R <sub>f</sub>	fator de retenção
<i>s</i>	singleto
SBF	soro fetal bovino
SI	“Système Internationale d’Unités”
Sol.	solução

<i>t</i>	tripleto
T.A	temperatura ambiente
TBA	ácido tiobarbitúrico
TFA	ácido trifluoracético
TMS	tetrametilsilano
UV	ultravioleta
v/v	volume-volume

## LISTA DE FIGURAS

---

<b>Figura 1.</b> Aspectos botânicos de <i>H. lancifolius</i> (Muell. Arg.) Woodson. Aspecto geral (A); folhas (B); cascas fragmentadas (C e D); cascas moídas (D).....	9
<b>Figura 2.</b> Etapas do processo metastático. As células tumorais multiplicam-se ativamente, tendendo a aderir e invadir os tecidos através da secreção e ativação de enzimas proteolíticas, tais como a matriz de metaloproteínases (MMP), atingindo os vasos linfáticos e os vasos sanguíneos.....	31
<b>Figura 3.</b> Eventos leucocitários na inflamação. Durante um processo inflamatório, os leucócitos, primeiramente rolam, fixam-se transitoriamente e aderem-se ao endotélio vascular, ocorrendo, então, a diapedese seguida da migração em direção aos estímulos quimiotáticos liberados no local da lesão.....	35
<b>Figura 4.</b> Isoformas da enzima NO sintase.....	39
<b>Figura 5.</b> Reação catalisada pela enzima NO-sintase.....	40
<b>Figura 6.</b> Mecanismo de vasodilatação mediado pelo óxido nítrico (NO), em resposta a vários estímulos. A enzima óxido nítrico sintase constitutiva (c-NOS) utiliza oxigênio molecular e o aminoácido L-argininina para formar o NO, que ativa a guanilil ciclase nas células da musculatura lisa vascular, aumentando o nível de monofosfato cíclico e guanosina (cGMP), produzindo relaxamento e vasodilatação.....	41
<b>Figura 7.</b> CCD do extrato aquoso acidificado (HCl 1%) revelado com reativo de Dragendorff usando como fase móvel <i>n</i> -hexano: EtOAc: MeOH: dietilamina 5:4:0,8:0,2.....	71
<b>Figura 8.</b> CCD das frações de alcalóides pH 10, 11, 12, 13, 14 e fração apolar revelado com reativo de Dragendorff usando como fase móvel <i>n</i> -hexano: EtOAc: MeOH: dietilamina 5:4:0,8:0,2.....	71
<b>Figura 9.</b> CCD da substância B1 revelado com orcinol usando como fase móvel propanol: água 7:3 (v/v) juntamente com um padrão de sacarose .....	71
<b>Figura 10.</b> Cromatograma da mistura de alcalóides AL1 e AL3 apresentando tempo de retenção próximos, com suas respectivas porcentagens de pureza (círculo), usando uma fase móvel de acetonitrila:metanol (1:1) grau HPLC, coluna C-8, fluxo de 0,8 ml/min e absorvância de 305 nm.....	73
<b>Figura 11.</b> Espectro de massas de AL1.....	77
<b>Figura 12.</b> Espectro de RMN <sup>13</sup> C (400MHz) da substância B1.....	83
<b>Figura 13.</b> Espectro de RMN <sup>13</sup> C (400MHz) da substância B1.....	83

<b>Figura 14.</b> Ensaio da capacidade antioxidante de extratos em diferentes concentrações após redução com o complexo fosfomolibdênico. As colorações mais claras ( <b>A</b> ) são resultantes de pouca transferência de elétrons, tornando-se mais escuras à medida que ocorre maior transferência de elétrons ( <b>B</b> ).....	86
<b>Figura 15.</b> Representação gráfica da AAR% das frações alcalinizadas das cascas de <i>H. lancifolius</i> (200 µg/ml) e substâncias isoladas tendo como base a atividade do ácido ascórbico. Cada coluna representa a média±EPM da porcentagem de AAR% em relação ao padrão de ácido ascórbico (n= 3-5, * $P \leq 0,001$ vs ácido ascórbico – Holm-Sidak). ANOVA do grupo ( $P \leq 0,001$ ).....	87
<b>Figura 16.</b> Representação de amostras mais diluídas (violetas) e mais concentradas (amarelas) de ácido ascórbico em solução de DPPH. Os tubos demonstram que a medida que o DPPH sofre redução pelo ácido ascórbico, observa-se mudança da coloração violeta original para uma coloração amarelada, cuja intensidade é proporcional à concentração de ácido ascórbico utilizado medido a 518 nm.....	88
<b>Figura 17.</b> Representação gráfica dos valores da IC% x Conc. (µg/ml) do ácido ascórbico comparados a uma linha de tendência polinomial (vermelha).....	89
<b>Figura 18.</b> Representação gráfica dos valores da IC% x Conc. (µg/ml) do ácido ascórbico comparados com uma linha de tendência linear (vermelha).....	90
<b>Figura 19.</b> Representação do programa utilizado para o cálculo direto da IC <sub>50</sub> tendo como base de cálculo o polinômio de lagrange.....	92
<b>Figura 20.</b> Efeito da uleína na atividade quimiotática de leucócitos humanos. Leucócitos de sangue periférico (10 <sup>6</sup> células) obtidos de voluntários sadios foram induzidos a migrar contra um gradiente de caseína 0,5% (C) ou uleína em diferentes concentrações (3,75x10 <sup>-15</sup> - 3,75x10 <sup>-4</sup> mol/l), por 90 min à 37 °C em câmara de Boyden, nos quais os compartimentos foram separados por um filtro de policarbonato com poro de 5 µm de diâmetro. Cada coluna representa a média±EPM do total de células recuperadas no compartimento inferior em relação ao controle negativo (PBSs), normalizadas em 100% (n=5-6) <sup>#</sup> $P < 0,05$ (teste <i>t</i> ou Mann-Whitney); * $P < 0,05$ em relação à caseína (teste <i>t</i> ou Mann-Whitney). ANOVA do grupo ( $P < 0,05$ ).....	97
<b>Figura 21.</b> Efeito da uleína sobre a quimiotaxia de leucócitos humanos induzidos pela caseína. Leucócitos humanos obtidos de doadores sadios foram incubados por 30 min a 37 °C, com as concentrações indicadas de uleína e induzidos a migrar contra um gradiente de caseína 0,5% (p/v) por 90 min a 37 °C, em câmara de Boyden. Cada coluna representa a média±EPM da porcentagem de células migradas em relação àquelas não tratadas (normalizada em 100%), de experimentos independentes submetidos às mesmas condições (n=3-14), * $P \leq 0,05$ (ANOVA seguido de teste Holm-Sidak).....	99
<b>Figura 22.</b> Comparação da eficiência da dexametasona ( <b>D</b> ) ou uleína ( <b>U</b> ) sobre a inibição da quimiotaxia de leucócitos humanos estimulada por caseína ( <b>C</b> ). Leucócitos obtidos de doadores sadios pré-tratados com dexametasona (10 <sup>-5</sup> mol/l; n=11) ou uleína (3,75x10 <sup>-12</sup> mol/l; n=14) foram submetidos ao ensaio de quimiotaxia induzida por caseína a 0,5%, em	

câmara de Boyden, por 90 min à 37 °C. As colunas representam a MÉDIA±EPM de leucócitos recuperados do compartimento inferior da câmara em relação à população controle (não tratada). Comparação estatística foi realizada usando o teste *t* ou Holm-Sidak contra o grupo controle – \**P*≤0,05. *P*≤ 0,05 entre <sup>#</sup>D vs U (Holm-Sidak). ANOVA do grupo (*P*≤ 0,05)..... 100

**Figura 23.** Efeito da morfina e naloxona sobre a quimiotaxia de leucócitos humanos induzidos pela caseína. Leucócitos humanos obtidos de doadores sadios foram incubados por 10 min a 37 °C, com diferentes concentrações de morfina ( $10^{-8}$  –  $10^{-4}$  mol/l) ou naloxona ( $10^{-8}$  –  $10^{-5}$  mol/l) e induzidos a migrar contra um gradiente de caseína 0,5% (p/v) por 90 min a 37 °C em câmara de Boyden. Cada coluna representa a média±EPM da porcentagem de células migradas em relação àquelas não tratadas (controle) normalizada em 100%, de experimentos independentes submetidos às mesmas condições (n=17-18), \**P*≤0,05 quando comparado ao grupo controle (Holm-Sidak)..... 102

**Figura 24.** Efeito da uleína (U), morfina (M) e naloxona (N) sobre a quimiotaxia de leucócitos humanos induzida por caseína. Leucócitos de doadores sadios isolados por centrifugação foram pré-tratados com uleína ( $3,75 \times 10^{-12}$  mol/l), morfina ( $10^{-4}$  mol/l) e naloxona ( $10^{-8}$  mol/l), isolados ou em associação, seguido por tratamento com morfina, naloxona ou uleína sendo induzido a migrar contra um gradiente de caseína 0,5% (p/v) em câmara de Boyden, por 90 min, a 37 °C, nos quais os compartimentos foram separados por filtros de polycarbonatos com poros de 5 µm. Cada coluna representa a média±EPM das células recuperadas no compartimento inferior em relação à população não-tratada (C), normalizada em 100% (n=8-18). Comparação estatística foi realizada usando o teste de Tukey ou Holm-Sidak contra o grupo controle - \**P*≤0,05; *P*≤0,05 entre \*\*M vs N ou N+M (Holm-Sidak); \*\*\**P*≤0,05 entre M+U vs N ou N+M (Holm-Sidak); <sup>#</sup>*P*≤0,05 entre N vs N+U ou U ou U+M ou U+N ou N+M (Holm-Sidak); <sup>##</sup>*P*≤0,001 entre N+U vs N+M (Holm-Sidak); <sup>\$</sup>*P*≤0,001 entre U vs N+M (Holm-Sidak); <sup>©</sup> *P*≤0,001 entre U+M vs N+M (Holm-Sidak); <sup>&</sup>*P*≤0,001 entre U+N vs N+M (Holm-Sidak)..... 104

**Figura 25.** Efeito da administração intraperitoneal da dexametasona (0,5 mg/kg, i.p.) e uleína (0,5 g/kg, i.p.) sobre a migração leucocitária para o líquido peritoneal ( $\times 10^7$ /ml) induzido pela injeção de carragenina 1%. Cada coluna representa a média±EPM das células migradas para o líquido peritoneal (n=10), \**P*<0,01 quando comparados ao grupo controle; <sup>#</sup>*P*<0,05 quando comparados ao grupo carragenina (ANOVA, seguida do teste de Tukey)..... 108

**Figura 26.** Efeito da uleína na adesão celular de células melanoma de camundongos (B16F10), na ausência de matriz extracelular. Células B16F10 ( $10^6$  células/ml) obtidos de American Type Culture Collection (cat # ATCC CRL-6475) foram induzidas a aderir na presença de uleína, em diferentes concentrações, por 90 min à 37 °C/5% de tensão de CO<sub>2</sub>. Cada coluna representa a média±EPM da porcentagem de células aderidas e medida em espectrofotômetro a 540 nm, em relação ao controle, normalizada em 100% (n=10), \**P*≤0,05 em relação ao controle (Holm-Sidak). ANOVA do grupo (*P*≤0,05)..... 114

**Figura 27.** Efeito da uleína na adesão celular de células endoteliais de aorta de coelho (RAEC), na ausência de matriz extracelular. Células RAEC ( $10^6$  células/ml) foram induzidas a aderir na presença de uleína, em diferentes concentrações (0,01 – 100 µg/ml), por 90 min à 37 °C/5% de tensão de CO<sub>2</sub>. Cada coluna representa a média±EPM da porcentagem de

células aderidas e medida em espectrofotômetro a 540 nm, em relação ao controle, normalizada em 100% (n=5). \* $P \leq 0,05$  em relação ao controle (Holm-Sidak). ANOVA do grupo ( $P \leq 0,05$ )..... 115

**Figura 28.** Adesão de células melanoma B16F10 induzida pela uleína. As fotomicrografias (100X) mostram a adesão de células B16F-10 após serem cultivadas em meio RPMI 1640 (Cultilab) suplementado com soro fetal bovino (SBF 10%), estreptomicina (10 µg/ml) e penicilina (100 UI/ml), mantida em atmosfera de 37 °C e 5 a 7% de tensão de CO<sub>2</sub> como controle (A) e em presença de uleína na concentração de 10<sup>-6</sup> µg/ml (B) e 10<sup>-1</sup> µg/ml (C), contrastando com a forma não aderida, esférica, da população tratada com 100 µg/ml de uleína (D)..... 117

**Figura 29.** Efeito da atividade aderente da uleína (10<sup>-5</sup> – 10 µg/ml) em células B16F10 para a fibronectina, laminina, vitronectina e na ausência de matriz extracelular..... 118

**Figura 30.** Efeito da uleína (U), lipopolissacarídeo (L) e L-NAME (N) na produção de óxido nítrico em células endoteliais de aorta de coelho (RAEC). Células endoteliais foram tratadas com uleína (U1-0,01; U2-0,1; U3-1; U4-10; U5-100 µg/ml), lipopolissacarídeo (100 ng/ml) e L-NAME (1 µg/ml), isolados ou em associação. Cada coluna representa a média±EPM da quantificação do nitrito medida em espectrofotômetro a 540 nm (n=3-5), \* $P \leq 0,05$  (ANOVA seguido de teste de Kruskal-Wallis)..... 124

**Figura 31.** Efeito da uleína (U), lipopolissacarídeo (L) e L-NAME (N) na produção de óxido nítrico em mouse melanoma cells (B16F10), American Typical Culture Collection (cat # ATCC CRL-6475). Células melanoma foram tratadas com uleína (U1-0,01; U2-0,1; U3-1; U4-10; U5-100 µg/ml), lipopolissacarídeo (100 ng/ml) e L-NAME (1 µg/ml), isolados e em associação. Cada coluna representa a média±EPM da quantificação do nitrito medida em espectrofotômetro a 540 nm (n=3-5), \* $P \leq 0,05$  em relação ao controle (ANOVA seguido de teste de Holm-Sidak ou Tukey)..... 124



## LISTA DE TABELAS

---

<b>Tabela 1.</b> Enquadramento taxonômico de <i>Himatanthus lancifolius</i> (Muell. Arg.) Woodson	<b>6</b>
<b>Tabela 2.</b> Panorâmico químico-farmacológico de espécies do gênero <i>Himatanthus/Plumeria</i> .....	<b>24</b>
<b>Tabela 3.</b> Abordagem fitoquímica das cascas de <i>Himatanthus lancifolius</i> (Muell. Arg.) Woodson, Apocynaceae.....	<b>69</b>
<b>Tabela 4.</b> Determinação da IC <sub>50</sub> do padrão antioxidante (ácido ascórbico), frações de alcalóides em diferentes pH e substâncias isoladas.....	<b>92</b>
<b>Tabela 5.</b> Determinação da média da IC <sub>50</sub> com seus desvios padrões médios (%) de frações de alcalóides com diferentes pH e substâncias isoladas utilizando três metodologias diferentes.....	<b>94</b>
<b>Tabela 6.</b> Efeito de gradientes de concentração de uleína sobre leucócitos humanos em tempos diferentes. A viabilidade é representada pela média±EPM do total de células viáveis em relação às células não tratadas com uleína (n=3).....	<b>96</b>
<b>Tabela 7.</b> Resultados da análise antimicrobiana da fração apolar, FAA pH10,11,12,13 e 14 das cascas de <i>Himatanthus lancifolius</i> dissolvidas em DMSO.....	<b>111</b>
<b>Tabela 8.</b> Resultado da análise da uleína dissolvida em DMSO contra microrganismos gram positivos e gram negativos.....	<b>111</b>
<b>Tabela 9.</b> Atividade antimicrobiana da FAA pH10 de <i>Himatanthus lancifolius</i> dissolvida em DMSO contra patógenos gram positivo e gram negativo.....	<b>112</b>
<b>Tabela 10.</b> Atividade antimicrobiana da FAA pH10 de <i>Himatanthus lancifolius</i> dissolvida em etanol contra patógenos gram positivo e gram negativo.....	<b>113</b>

## LISTA DE ESQUEMAS

---

<b>Esquema 1.</b> Ciclo biossintético resumido dos metabólitos secundários.....	<b>11</b>
<b>Esquema 2.</b> Biossíntese do ácido chiquímico.....	<b>13</b>
<b>Esquema 3.</b> Origem biossintética dos aminoácidos aromáticos originando os principais núcleos dos alcalóides.....	<b>14</b>
<b>Esquema 4.</b> Origem dos derivados hidroxilados simples.....	<b>16</b>
<b>Esquema 5.</b> Relação biossintética das classes de alcalóides indólicos monoterpênicos. Uma única estrutura sendo utilizada para representação de cada classe de alcalóide indólico.....	<b>19</b>
<b>Esquema 6.</b> Biossíntese dos alcalóides indólicos.....	<b>22</b>
<b>Esquema 7.</b> Processo de extração, partição, isolamento e identificação dos metabólitos secundários das cascas de <i>H. lancifolius</i> pelo método A.....	<b>49</b>
<b>Esquema 8.</b> Processo de extração, isolamento e identificação de substâncias das cascas de <i>H. lancifolius</i> pelo método B.....	<b>53</b>
<b>Esquema 9.</b> Fragmentação do espectro de massas de AL1.....	<b>75</b>
<b>Esquema 10.</b> Fragmentação do espectro de massas de AL1.....	<b>76</b>

## RESUMO

---

*Himatanthus lancifolius* (Muell. Arg.) Woodson, Apocynaceae, uma planta nativa das regiões de Minas Gerais, Espírito Santo, Rio Grande do Sul, Goiás e abundantemente na Amazônia, mais conhecida como *agoniada*, têm sido indicada na medicina tradicional para o tratamento de diversas enfermidades. Este trabalho teve por finalidade contribuir com o conhecimento da espécie através de avaliações das atividades biológicas das frações e substâncias isoladas de *Himatanthus lancifolius*. Os resultados demonstraram atividade antioxidante relativa de  $59,37 \pm 0,83\%$  para a fração alcaloídica pH10, enquanto que, para a uleína, esse efeito foi de  $0,59 \pm 0,09\%$  no ensaio de redução do complexo fosfomolibdênico. No ensaio do DPPH, a fração alcaloídica apresentou IC<sub>50</sub> de  $196,33 \pm 8,95 \mu\text{g/ml}$  e para a uleína  $6475,00 \pm 25,0 \mu\text{g/ml}$ . A uleína, principal alcalóide isolado da fração alcaloídica, estimulou uma produção máxima de óxido nítrico nas concentrações de  $0,1 \mu\text{g/ml}$  ( $20,90 \pm 1,41 \mu\text{M}$ ) e  $1 \mu\text{g/ml}$  ( $41,19 \pm 0,22 \mu\text{M}$ ) utilizando células RAEC e B16F10, respectivamente, demonstrando que o efeito da uleína nas células se dá através de estímulos nas vias de produção de óxido nítrico. Na investigação da resposta inflamatória, os dados demonstraram que a uleína não apresentou característica quimioatratória. Contudo, exposição de leucócitos humanos na concentração de  $3,75 \times 10^{-12} \text{ mol/l}$  de uleína resultou em uma significativa inibição da migração de PMN induzida por caseína, quando comparado com população celular tratada com dexametasona (DEXA). Esse efeito não foi resultante da toxicidade do alcalóide, tal como confirmado pelo teste de exclusão com azul de Trypan. Tratamento com morfina e naloxona, isolada ou em associação, antes ou após o uso da uleína, demonstraram bloquear parcialmente a atividade antiquimiotática, sugerindo que esses efeitos podem ser mediados por receptores opióides. Aumento nas concentrações de uleína estimula a adesão de células B16F10 e RAEC. A máxima atividade foi observada na concentração de  $5 \times 10^{-4} \mu\text{g/ml}$  e esse efeito pode ser produzido pela ligação da uleína nas proteínas de adesão presentes na superfície das células. Altas concentrações de uleína não favoreceram a adesão celular, indicando que essas apresentam condições de saturação nos receptores. Finalmente, a uleína demonstrou um largo espectro de atividade antimicrobiana *in vitro* para microrganismos gram positivo e gram negativo causadores de várias patogenias humanas, inclusive MRSA e cepa canina. Os resultados aqui apresentados mostraram alguns aspectos farmacológicos interessantes e desconhecidos das frações e das substâncias isoladas das cascas de *H. lancifolius* que podem conduzir a aplicações terapêuticas importantes.

**Palavras-chave:** *Himatanthus lancifolius*; *agoniada*; alcalóides indólicos; uleína; inflamação; antioxidantes; metástase; óxido nítrico; antimicrobiano; RAEC; B16F10.

## ABSTRACT

---

*Himatanthus lancifolius* (Muell. Arg.) Woodson (Apocynaceae) formerly known as *Plumeria lancifolia*, is popularly called *agoniada* in Brazil. The dried stem bark of this specie is commonly used in the folk medicina to treat several illness. This work aims to contribute to the knowlegment of the species and trthrough evaluation of the biological activities of the fractions and isolated compounds from *Himatanthus lancifolius*. The results demonstrated antioxidant activity of  $59.37 \pm 0.83\%$  for the alkaloidal fraction, while for uleine the effect was of  $0.59 \pm 0.09\%$  in the reduction of the phosphomolibdenium method. In the essay of DPPH, the alkaloidal fraction presented  $IC_{50} = 196.33 \pm 8.90 \mu\text{g/ml}$  and for the uleine  $6475.00 \pm 25.00 \mu\text{g/ml}$ . The uleine also stimulated a maximum production of nitric oxide in the concentrations of  $0.1 \mu\text{g/ml}$  ( $20.90 \pm 1.41 \mu\text{M}$ ) and  $1 \mu\text{g/ml}$  ( $41.19 \pm 0.22 \mu\text{M}$ ) using RAEC and B16F10 cells, respectively, demonstrating that the effect of the uleine in the cells occurs by promoting the pathway of production of nitric oxide and not for a scavenger effect of free radical. The investigation of inflammatory response, in the data showed that alkaloid has no chemoattractant characteristic. However, exposition of human leukocytes to  $3.75 \times 10^{-12} \text{ mol/l}$  uleine resulted in a significant inhibition of the PMN migration induced by casein, when compared with the untreated cell population or with DEXA-treated cells. This effect was not resultant of alkaloid toxicity as confirmed by a dye exclusion test. Treatment with morphine or naloxone, singly or in association, before or after the use of uleine, could partially block the anti-chemotactic activity suggesting that these effects may be opioid receptors' mediated. Results showed that low concentrations of uleine stimulated cellular adhesion in B16F10 and RAEC cells. In addition, higher uleine concentrations did not further increase cellular adhesion, indicating saturating conditions. Also, uleine showed a broad-spectrum *in vitro* antimicrobial activity for the gram (+) and gram (-) tested microorganisms, including MRSA and canine pathogens. The results herein presented have revealed some interesting and unknown pharmacological aspects of compounds isolated, indole alkaloids purified from an extract prepared from the barks *H. lancifolius*, which therapeutic applications must be pursued.

**Key Words:** *Himatanthus lancifolius*; *agoniada*; indole alkaloids; uleine; inflammation; antioxidant; nitric oxide; antimicrobial activity; cellular adhesion; metastasis; RAEC; B16F10.



## INTRODUÇÃO

---

As plantas são fontes importantes de produtos naturais biologicamente ativos, muito dos quais se constituem em modelos para a síntese de um grande número de fármacos. Pesquisadores da área de produtos naturais mostram-se impressionados pelo fato desses produtos encontrados na natureza revelarem uma gama quase que inacreditável de diversidade em termos de estrutura, propriedades físico-químicas e biológicas (Wani, Taylor *et al.*, 1971). Apesar do aumento dos estudos nessa área, os dados disponíveis revelam que apenas 15 a 17% das plantas foram estudadas quanto ao seu potencial medicinal (Soejarto, 1996).

A partir da necessidade de se conhecer mais profundamente os produtos de origem natural e utilizá-los na terapêutica de forma correta e segura, surgiram na história da Farmácia, várias ciências que têm como objetivo estudar as virtudes da natureza, sobretudo as plantas, em prol do bem estar da humanidade (Costa, 1968).

A Farmacognosia, ciência tão antiga quanto a própria tradição farmacêutica, tem por objetivo o conhecimento dos fármacos abrangendo seus aspectos botânicos, químicos e farmacodinâmicos, apoiando-se nesses três pilares para substituir o empirismo com que as plantas medicinais eram utilizadas pelo caráter científico (Costa, 1968).

Embora os produtos sintéticos desempenhem papel importante na terapêutica moderna, a Farmacognosia, através do estudo contínuo das plantas medicinais tem encontrado substâncias medicamentosas naturais usadas diariamente no tratamento de enfermidades, cuja síntese ainda não foi obtida. Os digitálicos constituem exemplo típico desse fato. O custo elevado dos processos de sínteses de uma série de substâncias naturais, por outro lado, faz com que elas continuem sendo obtidas de vegetais. Outro fato digno de nota é o de certos vegetais encerrarem conjunto de princípios ativos, cuja ação farmacodinâmica é mais conveniente do que um desses princípios ativos isolados (Oliveira e Akisue, 1987).

Hoje, detêm-se muitas informações sobre as substâncias ativas das plantas e seus mecanismos de ação, auxiliando seu uso já bastante difundido. O consumo, indo desde o caseiro até suas utilizações nas mais modernas indústrias farmacêuticas, vem crescendo a cada dia (Toledo, 1997). Estima-se que existam cerca de 25 a 75 mil espécies vegetais utilizadas nas medicinas tradicionais do mundo, das quais apenas 1% são conhecidas por estudos científicos com comprovação de seu valor terapêutico, quando administradas em seres humanos (Vicente, 1994).

Dentre as substâncias ativas a serem investigadas, parcela de interesse pode ser atribuída ao estudo dos alcalóides, pois sabe-se que sua administração em humanos promove, inexoravelmente, enérgica alteração fisiológica e também porque tem sido uma abundante fonte de substâncias úteis na terapêutica (Cordell, 1981).

Desde a descrição do sal de ópio por Derosne (1803), trabalhos de Seturner (1805) sobre o *Principium somniferum* e a identificação da estrutura da morfina por Robinson e Gulland (1923), os alcalóides têm despertado grande interesse tanto para químicos, pelas suas propriedades, como para farmacologistas, por suas ações terapêuticas e também para botânicos por suas correlações quimiotaxonômicas. Os alcalóides podem ser definidos como sendo bases nitrogenadas orgânicas encontradas principalmente em plantas, porém em menor extensão em animais e microorganismo. Um ou mais átomos de nitrogênio estão presentes, sendo tipicamente classificados como aminas primárias, secundárias ou terciárias, o que confere o caráter básico dos alcalóides, facilitando seu isolamento e purificação. O grau de basicidade varia extensamente, dependendo da estrutura do alcalóide e da presença e localização de outros grupos funcionais (Dewick, 2002). Os alcalóides apresentam sempre ação farmacológica ou tóxica quando administrado em animais (Henriques, Kerber *et al.*, 1999).

Os alcalóides constituem-se num vasto grupo de metabólitos com grande diversidade estrutural, comparável aos terpenóides, representando cerca de 20% das substâncias naturais

descritas. Esse grupo químico tem apresentado um grande impacto através dos tempos na economia, medicina e em outros setores sociais e políticos.

Devido ao elevado número de atividade biológica atribuída aos alcalóides, estes foram continuamente objetos de estudos. Muitos outros alcalóides foram e continuam sendo descritos e seu uso introduzido na terapêutica, como, por exemplo, os alcalóides antitumorais isolados de *Catharanthus roseus* G. Don. (Henriques, Kerber *et al.*, 1999).

Uma classe de substâncias que possuem grande importância econômica devido às suas atividades farmacológicas e constituída pelos alcalóides com estrutura básica do indol é o dos alcalóides indólicos. Essas estavam entre as primeiras substâncias isoladas das plantas, mas, devido às fórmulas químicas complexas (especialmente dos alcalóides indólicos monoterpênicos), a determinação de suas estruturas era difícil e demorada. Podem ser citadas como exemplo dessas substâncias a vincristina e a vimblastina, que são antineoplásicos importantes; a ergotamina que é um importante fármaco contra a migraína; a ajmalicina, fármaco usado em distúrbios do fluxo sanguíneo e a reserpina como agente hipotensor (Schripsema, Dagnino *et al.*, 1999).

Cascas de *Himatanthus lancifolius* (Muell. Arg.) Woodson, Apocynaceae, uma planta nativa das regiões de Minas Gerais, Espírito Santo, Rio Grande do Sul, Goiás e abundantemente na Amazônia, mais conhecida como *agoniada*, tem sido indicada na medicina tradicional para o tratamento de várias doenças de pele, asma, sífilis, febre, estimulante nas contrações uterinas auxiliando na concepção, regularizando as menstruações, corrimento vaginal e afecções herpéticas (Correa, 1984), sendo que seu uso sem determinado intervalo de tempo pode interferir no processo de coagulação. O nome *agoniada* provém do seu uso tradicional, sendo utilizada quando as mulheres tornam-se agoniadas pelas cólicas menstruais (Corrêa, Batista *et al.*, 1998).

Considerando que plantas da família Apocynaceae são bastante conhecidas pela presença desses alcalóides derivados do triptofano, com núcleo indólico, e que apresentam



grande número de substâncias com reconhecida atividade farmacológica, desde 1992, o Laboratório de Farmacognosia, Departamento de Farmácia da Universidade Federal do Paraná, em trabalho conjunto com os pesquisadores do Departamento de Farmacologia dessa mesma instituição, desenvolvem pesquisas farmacológicas e toxicológicas pré-clínicas utilizando a fração rica em alcalóides e substâncias isoladas de *Himatanthus lancifolius*. A finalidade é avaliar as ações dessa fração e substâncias isoladas sobre a musculatura lisa vascular, não vascular e esquelética possibilitando a caracterização do mecanismo de ação das substâncias em estudo, utilizando técnicas *in vitro* e *in vivo*. Atualmente, pelos bons resultados obtidos, esses estudos têm sido diversificados pela equipe de trabalho, principalmente no campo da quimiotaxia leucocitária, estudos antioxidantes, atividades antimicrobianas, teste de adesão celular e dosagem do óxido nítrico em células RAEC e B16F10, partindo do princípio que os estudos envolvendo *Himatanthus lancifolius*, como outras espécies desse gênero, foram no passado priorizados para a sua caracterização química, sendo que as atividades biológicas têm sido raramente mencionadas na literatura científica.

Os conhecimentos adquiridos para orientar os nossos estudos enfocando *Himatanthus lancifolius* (Muell. Arg.) Woodson, Apocynaceae e relacionando-a principalmente a sua ação nos níveis pressóricos de ratos anestesiados conduziram a resultados preliminares bastantes satisfatórios. No estudo fitoquímico de *Himatanthus lancifolius* (Muell. Arg.) Woodson verificou-se a presença de uma grande quantidade de alcalóides com núcleo indólico, sendo essa espécie relatada na literatura como a única do gênero possuidora desses produtos do metabolismo secundário. A fração de alcalóides da agoniada (FAA) revelou, através de métodos cromatográficos, possuir vários alcalóides diferentes, dos quais quatro foram isolados e apenas duas substâncias puderam ser identificadas através de dados espectrométricos usuais (Franca, Brown *et al.*, 2000).

A planta em estudo mostra grande potencial não somente pelo seu conteúdo em alcalóides do grupo indol, os quais tem sido ao longo do tempo fonte de moléculas úteis na terapêutica, mas também pela atividade hipotensora apresentada nos estudos farmacológicos preliminares da fração de alcalóides de *Himatanthus lancifolius*. Com base nesses dados, faz-se necessário realizar o isolamento e a identificação de outros alcalóides em quantidades suficientes para possibilitar estudos mais avançados, visando o aproveitamento do potencial biológico desses e das substâncias anteriormente isoladas.

Pelo fato dos testes preliminares apresentados no decorrer desse trabalho, serem efetuados com a fração de alcalóides da agoniada, convencionou-se adotar a sigla FAA, tendo em vista que as possíveis atividades dessa planta estejam ligadas à presença de alcalóides, principal produto natural secundário encontrado nessa família.

## CONSIDERAÇÕES GERAIS

---

### POSIÇÃO SISTEMÁTICA DA ESPÉCIE

O enquadramento taxonômico de *Himatanthus lancifolius* (Muell. Arg.) Woodson, segundo Cronquist (Cronquist, 1988) e Engler (Joly, 1998), encontra-se inserido na Tabela 1.

**Tabela 1.** Enquadramento taxonômico de *Himatanthus lancifolius* (Muell. Arg.) Woodson.

<b>Taxa</b>	Segundo (Cronquist, 1988)	Segundo Engler (Joly, 1998)
<b>Divisão</b>	Magnoliophyta	Angiospermae
<b>Classe</b>	Magnoliatae	Dicotyledoneae
<b>Subclasse</b>	Asteridae	Sympetaleae
<b>Ordem</b>	Gentianales	Gentianales
<b>Família</b>	Apocynaceae	Apocynaceae
<b>Gênero</b>	<i>Himatanthus</i>	<i>Himatanthus</i>
<b>Espécie</b>	<i>Himatanthus lancifolius</i> (Muell. Arg.) Woodson *	<i>Himatanthus lancifolius</i> (Muell. Arg.) Woodson *

### DIFERENCIAÇÃO DO GÊNERO *Himatanthus* e *Plumeria*

O trabalho realizado por Woodson em 1951 no Missouri Botanical Garden confirmou a proposta de autoria de Willdenow, que previa a separação dos gêneros *Plumeria* e *Himatanthus* (Woodson, 1951). Dessa forma, pôde ser corrigido o engano cometido por Mueller Argoviensis que classificou como um só gênero as espécies.

---

\***Basionimo:** *Plumeria lancifolia* Muell. Arg

Fica evidente no trabalho de Woodson que Mueller Argoviensis não conhecia o sistema que descrevia o gênero *Himatanthus* Wild., proposto anos antes no sistema de Roemer e Schultes. Esta proposta foi baseada em um relatório com descrições satisfatórias gerais e específicas, da análise entre outros de uma espécie constituída de amplas brácteas, e que foi coletado no nordeste do Brasil.

Posteriormente o grupo do Laboratoire de Phanerogamie, Museum National D'Histoire Naturelle, em Paris, revisou esse estudo (Plumel, 1991). Examinando todas as espécies e as referências bibliográficas, confirmou a separação dos gêneros em questão, fornecendo informações adicionais baseando-se na pesquisa de abundante material botânico. Ainda foi possível distinguir 14 espécies desse gênero, entre as quais, várias espécies descritas inicialmente por Mueller Argoviensis e reclassificadas por sinonímia por Woodson, sendo elas: *H. obovatus*, *H. drasticus*, *H. falax*, *H. articulatus*, *H. sucuuba*, *H. phaedaenicus*, *H. bracteatus*, *H. attenuatus*, *H. semilunatus*, *H. phagedaenicus*, *H. terapotensis*, *H. speciosus*, *H. stenophyllus* e *H. lancifolius* (Coimbra, 1994).

Estudos da morfologia das folhas e das flores do gênero *Himatanthus* levaram a distinção de dois subgêneros: *Obovate* e *Lanceolate*. O primeiro tem lâminas foliares oblongas ou obovadas as quais são obtusas na base; o segundo tem lâminas foliares oblanceoladas ou espatuladas as quais são agudas na base (Plumel, 1991).

## DESCRIÇÃO BOTÂNICA

Planta conhecida popularmente como *sucuuba*, *agoniada*, *quina mole*, *arapué* ou *tapuoca*. É uma árvore de até 8 m de altura, com raízes muito compridas e caule lactescente (Figura 1-A) muito vista nas margens de estradas (terrenos semidesmatados), casca acinzentada,

folhas longo-grosso-pecioladas, opostas, lanceoladas, inteiras, agudas, glabras, até 25 cm de comprimento e 3 cm de largura (Figura 1-B); apresentam florações brancas em diferentes épocas do ano (Figura 1-A), principalmente em novembro, campanuladas, com base do tubo amarelada, grandes, dispostas no ápice dos ramos em cimeiras de 2 ou 3; frutos folículo geminados, fusiformes, de 9 cm contendo sementes (Correa, 1984).

As cascas apresentam-se em pedaços de forma irregular de 4, 10 ou mais centímetros de comprimento, enrolados quase sempre em cilindros de 1 a 1,5 cm de diâmetro, ou tendo os bordos recurvados. A espessura varia de 1 a 6 mm, conforme sejam provenientes dos ramos ou do tronco (Figura 1-C). A superfície externa das cascas provenientes dos ramos é de cor parda escura, com manchas pardas mais claras ou amareladas, alongadas no sentido longitudinal, e quase lisa; sua face interna é de cor mais escura, quase preta e lisa. A sua fratura é levemente granulosa. Sua secção transversal apresenta duas camadas de espessura desigual: uma porção externa ou peridérmica, mais espessa e de cor parda amarelada, um pouco mais carregada no exterior, e a parte liberiana, de cor mais escura (Santos, 1926).



<http://www.arvores.brasil.com.br/florin/agonia.htm>



<http://www.arvores.brasil.com.br/florin/agonia.htm>



[www.bio.uu.nl/.../Himatanthus%20lancifolius.html](http://www.bio.uu.nl/.../Himatanthus%20lancifolius.html)



[www.duke.edu/.../Himatanthus%20PN27050.jpg](http://www.duke.edu/.../Himatanthus%20PN27050.jpg)



Foto: Wesley Mauricio de Souza



Foto: Wesley Mauricio de Souza

**Figura 1.** Aspectos botânicos de *H. lancifolius* (Muell. Arg.) Woodson. Aspecto geral (A); folhas (B); cascas fragmentadas (C e D); cascas moídas (D).

## PRODUTOS DO METABOLISMO SECUNDÁRIO

A produção de substâncias naturais do metabolismo secundário é o resultado de interações complexas entre biossíntese, transporte, estocagem e degradação (Wink, 1990). Cada um desses processos, por sua vez, é governado por genes e, portanto, será influenciado por três fatores principais: hereditariedade, ontogenia (estágio de desenvolvimento) e ambiente (Robbers, Speedle *et al.*, 1996). A maioria dos mecanismos que regulam tanto a biossíntese quanto a estocagem e a degradação permanecem ainda desconhecidos.

Na maioria das células e organismos, as rotas metabólicas de síntese, degradação e interconversão das moléculas essenciais, bem como as reações que visam a conservação de energia, são similares (metabolismo primário ou intermediário). As rotas metabólicas das substâncias secundárias, entretanto, não são tão gerais e talvez só sejam ativadas durante alguns estágios particulares de crescimento e desenvolvimento ou em períodos de estresse causados por limitações nutricionais ou ataque microbiológico (Mann, 1987).

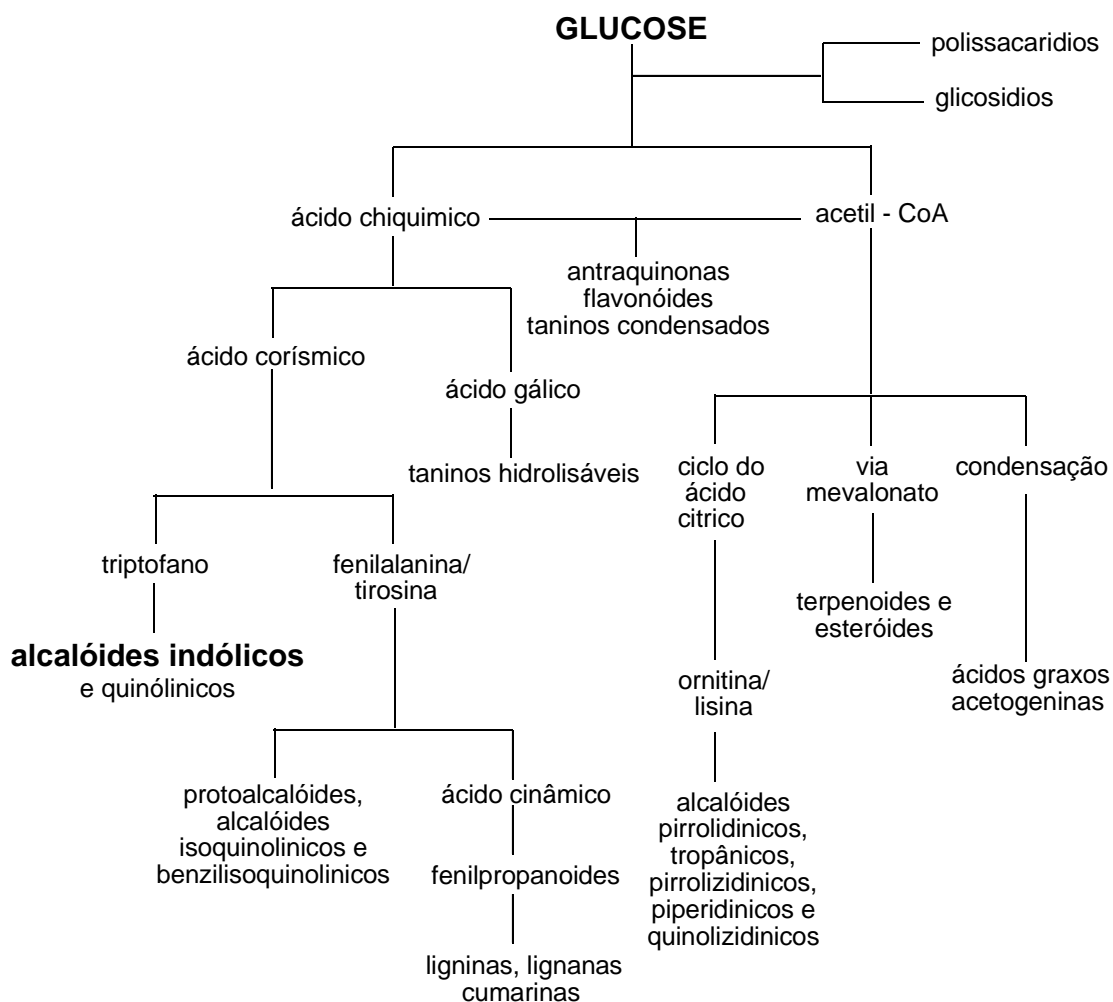
Embora classificadas como sendo do metabolismo primário ou do secundário, as reações bioquímicas não ocorrem independentemente em um mesmo produtor. Alterações no primeiro podem afetar profundamente o segundo e, embora o reverso não seja verdadeiro, alguns casos em que metabólitos secundários são convertidos em primários já foram descritos. Além disso, muitos metabólitos secundários são formados por sequência de reações análogas àquelas do metabolismo primário. Portanto, a linha divisória entre metabolismo primário e secundário não é nítida (Dewick, 2002).

A origem de todos os metabólitos secundários pode ser resumida a partir do metabolismo da glucose (I), via dois intermediários principais, o ácido chiquímico (II) e o

acetato. O ácido chiquímico origina os aminoácidos aromáticos, precursores da maioria dos metabólitos secundários aromáticos.

Alguns metabólitos secundários derivam não apenas de um desses intermediários, mas são resultantes da combinação de uma unidade de ácido chiquímico e uma ou mais unidades de acetato ou derivados deste, como é o caso das antraquinonas, flavonóides e dos taninos condensados.

Além disso, os metabólitos secundários podem ser encontrados na forma livre, sendo denominados genericamente de agliconas, ou estar ligados a uma ou mais unidades de açúcar, formando o que se denomina de glicosídios (Esquema 1).



**Esquema 1.** Ciclo biossintético resumido dos metabólitos secundários.

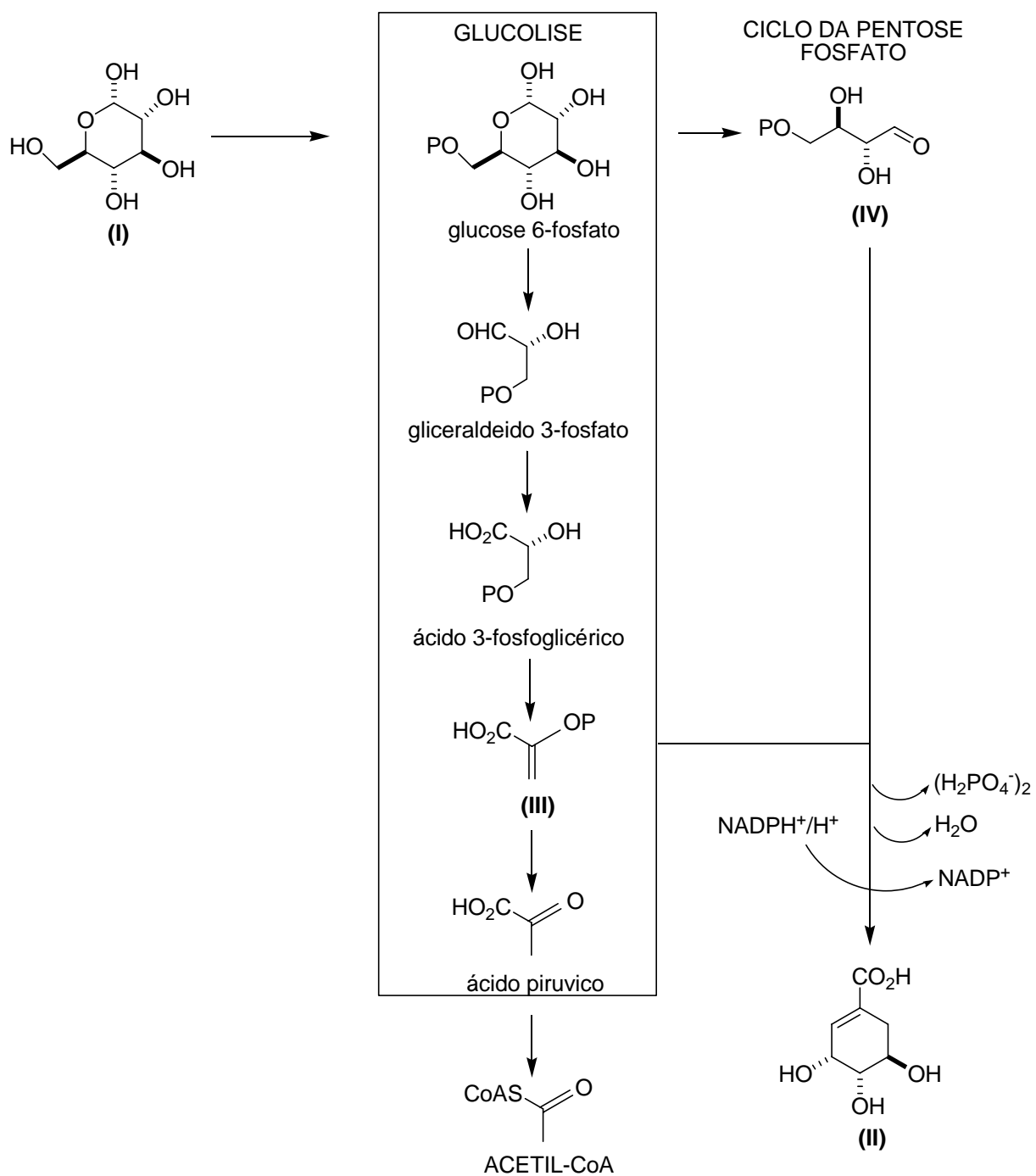


## Derivados do ácido chiquímico

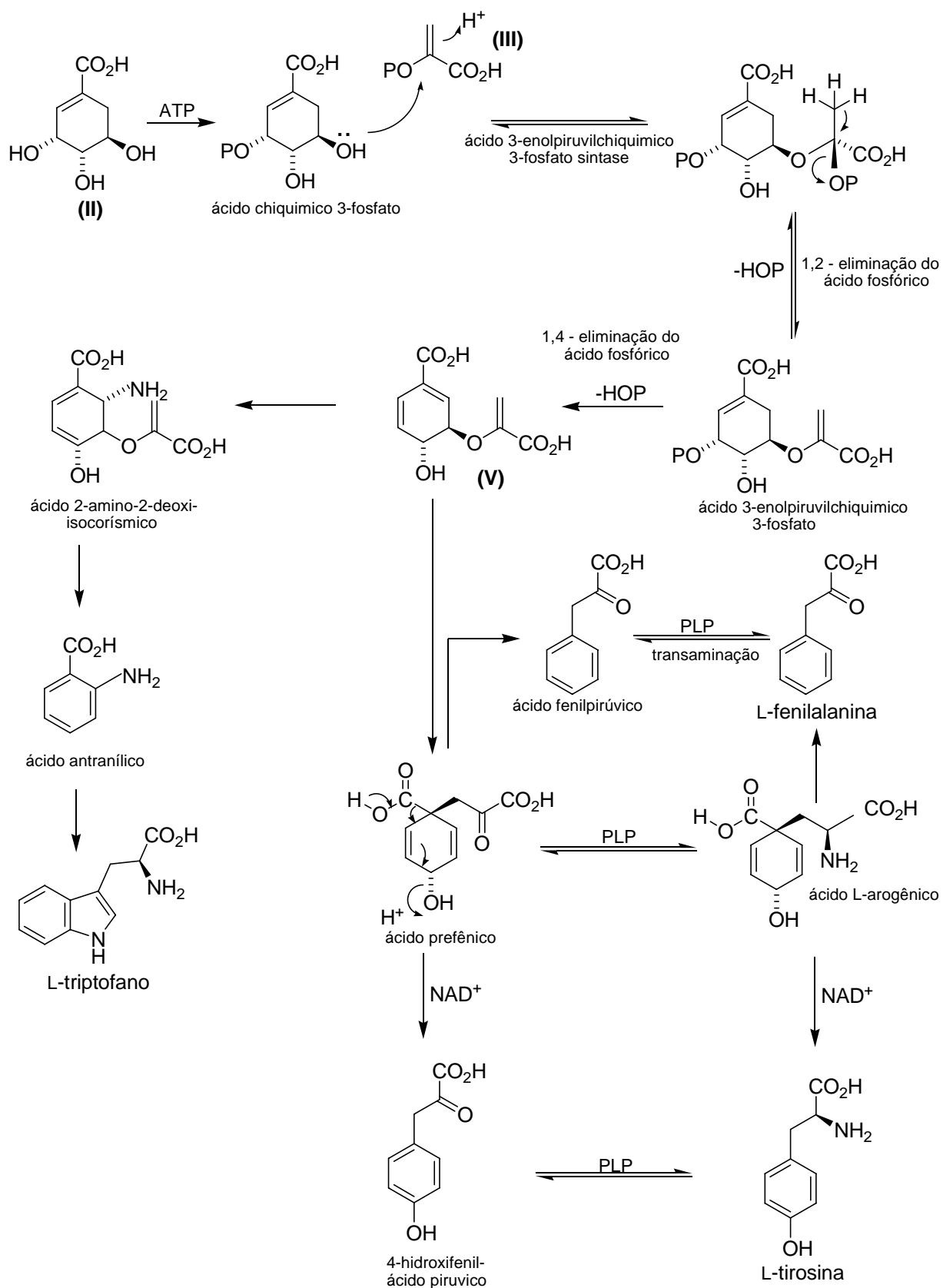
O ácido chiquímico (**II**) é formado pela condensação aldólica de dois metabólitos da glucose: o fosfoenolpiruvato (**III**) e a eritrose-4-fosfato (**IV**) (Esquema 2). Uma vez formado, o ácido chiquímico pode ser metabolizado em ácido corísmico (**V**) ou ácido gálico (**VI**) (Esquema 3). Como o pH prevalente na planta torna os ácidos ionizados, poder-se-ia designar esses metabólitos como chiquimato, corismato e galato, respectivamente.

O ácido corísmico, resultante de uma molécula de ácido chiquímico e uma de fosfoenolpiruvato, por sua vez, originam os aminoácidos aromáticos (Esquema 3), precursores de vários tipos de alcalóides.

Essas vias biossintéticas que formam os aminoácidos aromáticos estão presentes em plantas, fungos e bactérias, mas não são encontradas em animais. Por isso, os aminoácidos aromáticos, fenilalanina e triptofano, são considerados nutrientes essenciais na dieta dos animais, enquanto que a tirosina só não é considerada essencial porque pode ser formada a partir da fenilalanina.



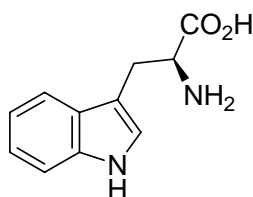
**Esquema 2.** Biossíntese do ácido chiquímico.



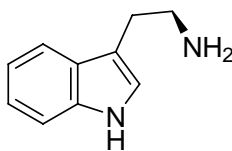
**Esquema 3.** Origem biossintética dos aminoácidos aromáticos originando os principais núcleos dos alcalóides.

## Alcalóides derivados do triptofano (VII)

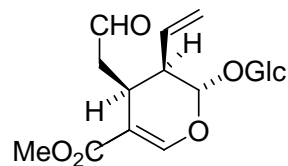
Os alcalóides indólicos são produtos naturais que contêm o núcleo do indol oxidado, reduzido ou com um substituto equivalente, como por exemplo, oxindol, pseudoxindol, diidroindol e o *N*-acilindol (Cordell, 1981). Podem ser divididos em duas classes principais: primeiro aqueles alcalóides indólicos mais simples, os quais não apresentam uniformidade estrutural e ocorrem amplamente distribuídas nas plantas. Apresentam a triptamina (VIII) e seus derivados *N*-metil e *N,N*-dimetil como simples derivados hidroxilados, tais como a 5-hidroxitriptamina (serotonina) (IX) e a psilocibina (X).



(VII)

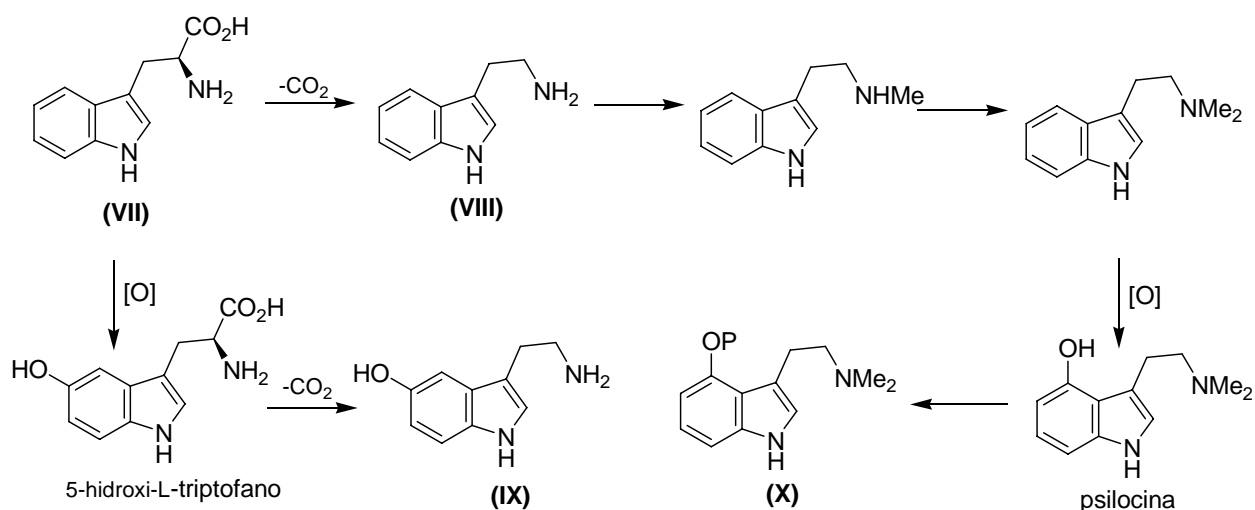


(VIII)



(XI)

Esses são formados por uma série de reações de descarboxilação, metilação e hidroxilação, embora as seqüências dessas reações sejam construídas de acordo com variações no produto final e/ou organismo envolvido (Esquema 4) (Dewick, 2002).



**Esquema 4.** Origem dos derivados hidroxilados simples (Dewick, 2002).

Os alcalóides simples baseados no sistema  $\beta$ -carbolina são exemplificados pela formação de um novo anel heterocíclico de seis membros usando o lado da cadeia de etilamina na triptamina em um processo análogo na geração de alcalóides tetrahidroisoquinólicos.

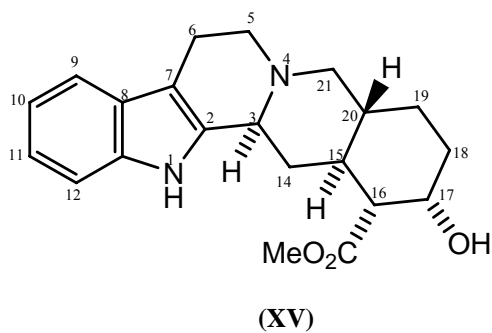
Uma segunda classe, que constituem um dos maiores grupos de alcalóides das plantas, são aqueles que contêm dois elementos estruturais: a triptamina (VIII), que é o produto de descarboxilação do triptofano (VII), com núcleo do indol e um monoterpreno com o esqueleto da secologanina (XI) (Cordell, 1981). Na prática, em todas as estruturas, uma parte da triptamina pode ser reconhecida. O fragmento que permanece é usualmente um resíduo C<sub>9</sub> ou C<sub>10</sub> e três principais tipos de fragmentos estruturais denominados corinanteano (XII), aspidospermano (XIII) e ibogano (XIV) (Esquema 6-B). O fragmento C<sub>9</sub> ou C<sub>10</sub> foi demonstrado ser de origem terpenóide e o secoiridóide secologanina foi identificado tal como um derivado terpênico, os quais inicialmente combinam com a porção de triptamina da molécula (Dewick, 2002).

## Alcalóides indólicos

### Classificação

Os alcalóides indólicos costumam ser classificados de acordo com os sistemas de anéis que constituem as principais partes de suas estruturas, os quais, por sua vez, podem ser classificados de acordo com o aminoácido precursor.

Le Men e Taylor (1965) propuseram um sistema de numeração para essas substâncias baseadas na sua biogênese sendo, hoje em dia, o sistema de numeração aceito. A numeração baseia-se no esqueleto da ioimbina (**XV**).



Esses autores distinguiram, naquela época, três classes de alcalóides indólicos monoterpênicos.

Classe I: *Corynanthé*

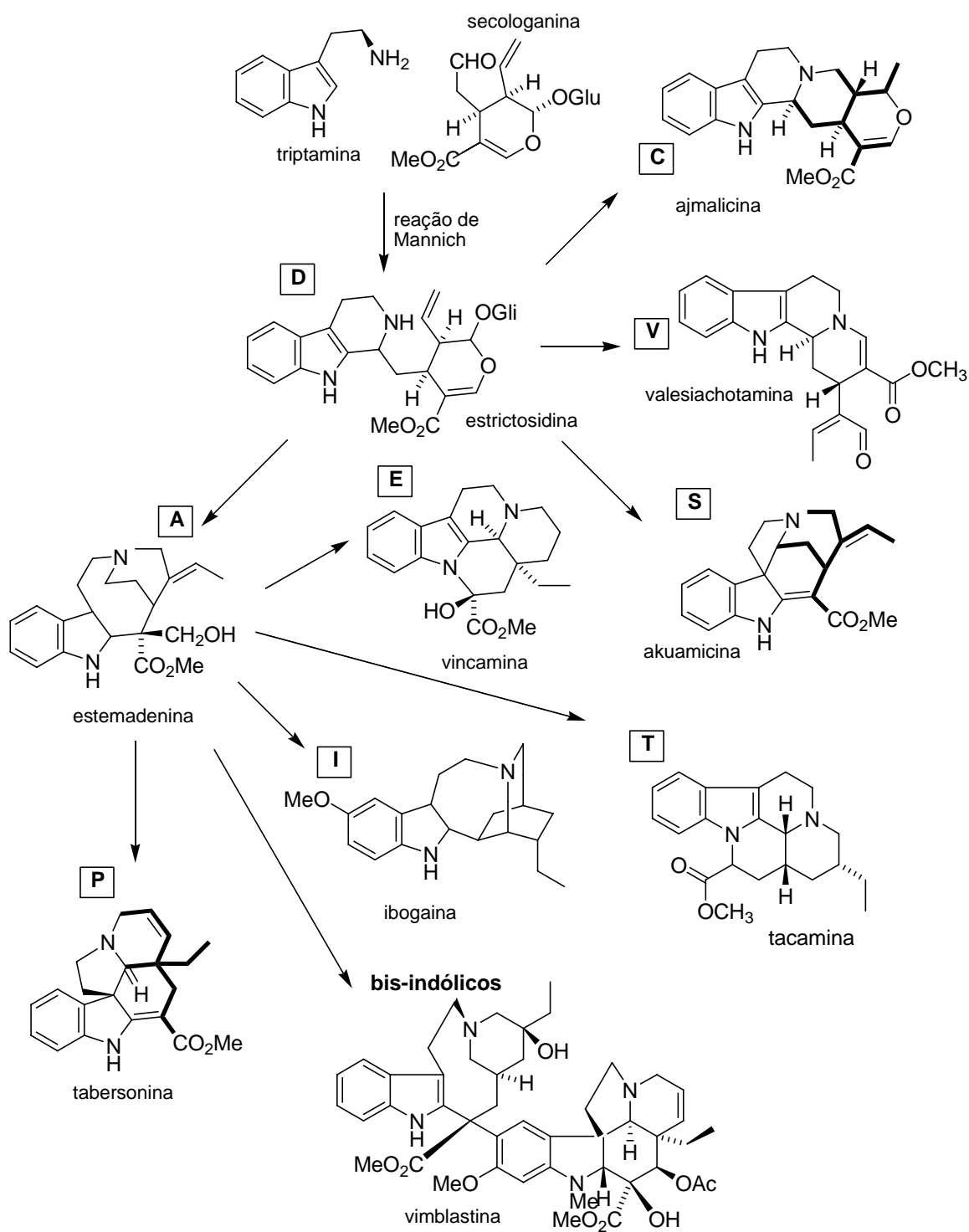
Classe II: *Iboga*

Classe III: *Aspidosperma*

Kisakurek e Hesse (1980) subdividiram os alcalóides indólicos monoterpênoides em oito classes (classes 1 a 8). Van Beek (1984) ampliou essa classificação, adicionando mais três classes. Foi criada uma classe para um novo arranjo de esqueleto de alcalóides indólicos monoterpênicos (Tacamano), uma classe para os alcalóides indólicos monoterpênicos diméricos e uma classe para todos os demais alcalóides indólicos monoterpênicos. Cada classe possui as seguintes características:

1. **C-** corinanteano, unidade C-2, C-3, C-14 e ligação entre N-4 e C-21 ou unidade C-7, C-3, C-14, ligação entre N-4 e C-21, e a função C-2 oxo.
2. **D-** vincosano, unidade C-2, C-3, C-14, HN-4 livre ou ligação entre N-4 e C-19 ou entre N-4 e C-18.
3. **V-** valesiachotamano, unidade C-2, C-3, C-14, ligação entre N-4 e C-17 ou entre N-4 e C-22.
4. **S-** estricnamo, unidade C-2, C-16, C-15, ligação entre C-3 e C-7.
5. **A-** aspidospermatano, unidade C-2, C-16, C-15, sem ligação entre C-3 e C-7.
6. **E-** eburnano, unidade N-1, C-16, C-17, C-20.
7. **P-** plumerano, unidade C-2, C-16, C-17, C-20.
8. **I-** ibogano, unidade C-2, C-16, C-17, C-14 ou C-7, C-16, C-17, C-14 e a função C-2 oxo.
9. **T-** tacamano, unidade N-1, C-16, C-17, C-14.
10. bis-indol
11. diversos

No esquema 5, cada classe é representada por uma única estrutura sendo indicada, também, a relação biossintéticas entre as classes.

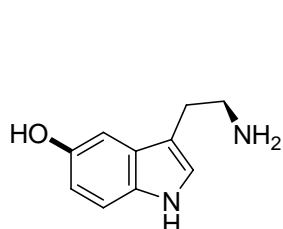


**Esquema 5.** Relação biossintética das classes de alcalóides indólicos monoterpênicos. Uma única estrutura está sendo utilizada para a representação de cada classe de alcalóide indólico.

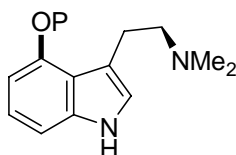


A maior parte dos outros alcalóides indólicos podem ser organizados nas seguintes classes:

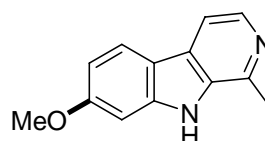
1. base simples, que são derivados simples do triptofano (**VII**), produtos da sua desaminação, descarboxilação, metilação e hidroxilação. Exemplos são triptamina (**VIII**), serotonina (**IX**) e psilocibina (**X**).
2.  $\beta$ -carbolina têm como característica em comum a presença de mais um anel de seis membros, sendo também conhecidos como alcalóides do tipo harmano. Um exemplo é o alcalóide harmina (**XVI**).
3. alcalóides do esporão-do-centeio, que possuem como característica em comum a presença do sistema de anéis denominados ergolínico (**XVII**).



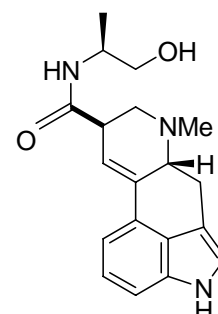
(VIII)



(X)



(XVI)



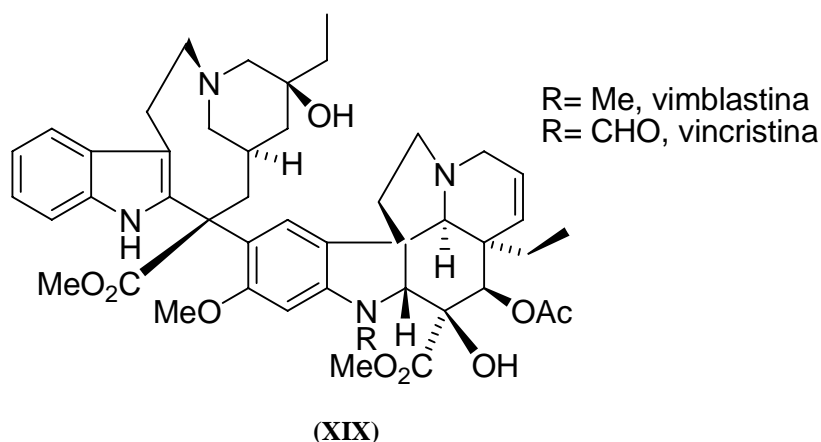
(XVII)

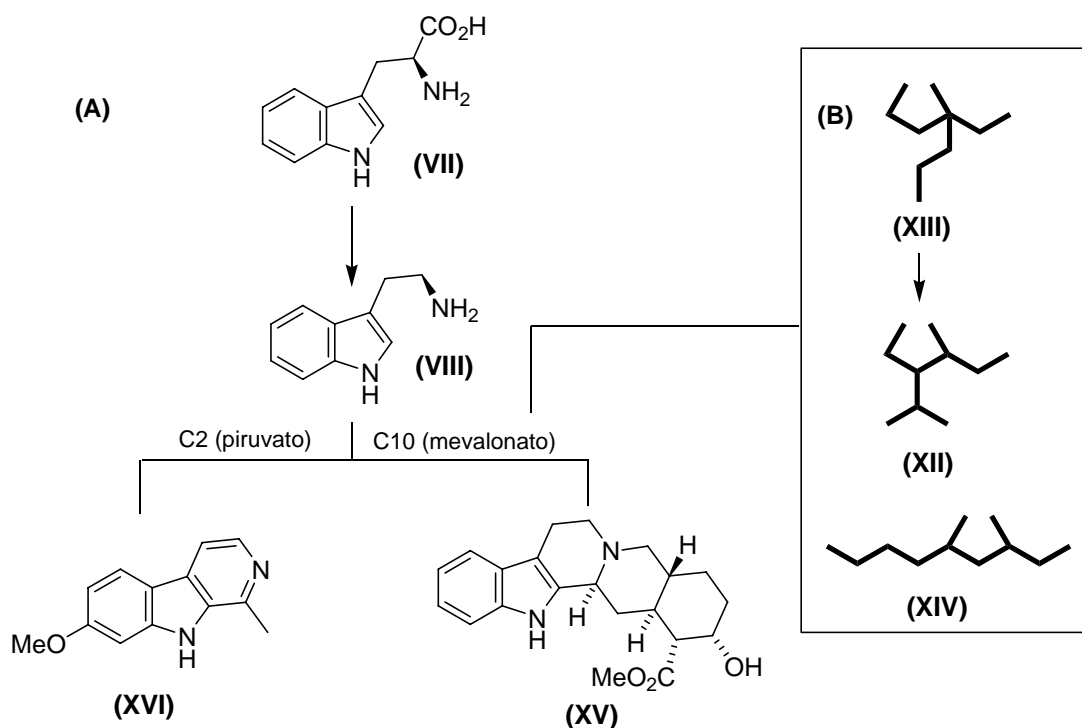
## Biogênese

O sistema indólico é derivado do aminoácido L-triptofano (**VII**), que por sua vez é descarboxilado pela enzima triptofano-decarboxilase formando triptamina (**VIII**) (Esquema 6A). A triptamina, bem como seus produtos de metilação e hidroxilação, é amplamente distribuída no reino vegetal.

Os alcalóides indólicos monoterpênicos são, quase sempre, produtos da condensação da triptamina com o secoiridóide secologanina (**XI**) (Esquema 5), que é formado a partir do monoterpene pirofosfato de geranila. A condensação de triptamina (**VIII**) com secologanina é catalizada pela enzima strictosidina sintase formando strictosidina (**XVIII**), um alcalóide glicosilado (Esquema 5). Por sua vez, a eliminação da glucose presente na strictosidina, pela strictosidina glucosidase, forma um produto instável, cuja estrutura ainda não foi esclarecida. A transformação desse intermediário, através de reações ainda não bem caracterizadas, leva à formação das várias classes dos alcalóides indólicos monoterpênicos. A partir dessa etapa, pouco se sabe sobre os detalhes das rotas biossintéticas que levam à formação de várias substâncias e somente algumas de grande importância farmacológica tiveram as últimas etapas da biossíntese investigada.

Assim, os alcalóides indólicos podem ser classificados como derivados do aminoácido triptofano (**VII**). Além deste, podem contribuir na estrutura final do alcalóide, unidade  $C_2$  proveniente do piruvato ou unidades  $C_5$  ou  $C_{9/10}$  provenientes do mevalonato (Esquema 6A). Os alcalóides indólicos mais complexos derivam de três esqueletos monoterpênicos ( $C_{10}$ ), formando os tipos aspidospermano (**XIII**), corinano (**XII**) e ibogano (**XIV**) (Esquema 6B). Dentre os exemplos de maior importância nesse grupo estão os alcalóides de *Catharanthus roseus* G. Don. (Apocynaceae), como os dímeros vincristina e vinblastina (**XIX**), empregados no tratamento de leucemia linfocítica aguda e uma variedade de neoplasma.





**Esquema 6.** Biossíntese dos alcalóides indólicos.

## REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

Constituição química, atividades farmacológicas e uso popular do gênero *Himatanthus/Plumeria*.

Muitas espécies do gênero *Himatanthus*, basionimo do gênero *Plumeria*, foram e estão sendo estudadas com relação a sua constituição química. Com isso, várias classes químicas e algumas substâncias de interesse medicinal foram isoladas e relatadas nos últimos anos (Tabela 2), porém muito pouco se conhece a respeito do potencial farmacológico dessas substâncias.

A variabilidade de climas e regiões no Brasil favorece o desenvolvimento de uma incomparável biodiversidade vegetal. Dentro dela, há um grande número de plantas usadas na medicina popular com finalidade terapêutica específica. Por exemplo, droga como a *agoniada* é amplamente utilizada pelo seu caráter empírico, mas não existem muitos relatos sobre estudos

científicos comprovando esses efeitos. Interessante notar, que muitos autores desconhecem o trabalho do Laboratoire de Phanerogamie, Museum National D'Histoire Naturelle, em Paris, que em uma ampla revisão bibliográfica, confirmou a separação dos gêneros *Himatanthus* e *Plumeria* proposto por Woodson (1951), conforme demonstrado por Record e Hess (1949) que não considerava distinção entre os gêneros, o que talvez justifique as escassas referências envolvendo o gênero *Himatanthus*.

**Tabela 2.** Panorâmico químico-farmacológico de espécies do gênero *Himatanthus/Plumeria*.

Espécies	Classes químicas	Substâncias	Atividade farmacológica			Referências
<i>Himatanthus spp</i>	Iridóides Triterpenóides Esteróides					Ferrigni, Nelson <i>et al.</i> (1976); Coppen e Cobb (1983); Tan, Pezzuto <i>et al.</i> (1991)
			*Malaria; *Gastrites	*Tumores;	*Artrites;	Coimbra (1994)
			Atividade inflamatória	moluscicida;	Espasmódica;	Endo, Hayashi <i>et al.</i> (1994); Souza, Azevedo <i>et al.</i> (1984)
<i>Himatanthus articulata</i>	Esteróide Triterpenóides	estigmasterol; sitosterol; cicloartenol $\alpha$ -amirina; cinamato de $\alpha$ -amirina; cinamato de $\beta$ -amirina; 3- $\beta$ -cinamato de $\alpha$ -amirina; 3- $\beta$ -cinamato de $\beta$ -amirina; 3- $\beta$ -acetato de $\alpha$ -amirina; 3- $\beta$ -acetato de $\beta$ -amirina; 3- $\beta$ -cinamato de lupeol; 3- $\beta$ -acetato de lupeol; ácido ursólico; metilmioinositol; Ácido 1 $\beta$ -O- $\beta$ -D glucopiranosilplumérico; 1 $\beta$ -O- $\beta$ -D-glucopiranosilplumerídeo; isoplumericina				Barreto (1998) Ferrigni, Nelson <i>et al.</i> (1976)
			*sifilitico			Van Den Berg (1982)
<i>Himatanthus lancifolius</i>	Iridóides	Glucosilplumerideo				Abisch e Reichsteris (1960)
			*Doenças de pele; *Asma; *Sífilis; *Estimulante das contrações uterinas			Correa (1984)
			Atividade microbiana contra bactérias gram positiva e gram negativa			Souza, Stinghen <i>et al.</i> (2004)
			Efeito gastroprotectivo nos experimentos de indução de lesão gástrica por etanol e redução de ácido gástrico induzido por ligadura pilórica			Baggio, De Martini Otofui <i>et al.</i> (2005)
			Alteração na resposta da musculatura lisa vascular e não vascular, envolvendo o bloqueio da entrada de cálcio, mudança			Rattmann, Terluk <i>et al.</i> (2005)

			na sua utilização ou mobilização	
	Alcalóides	Uleína	Atividade anti-úlceras	Finau <i>et al.</i> (1996)
			Estímulos nas vias de produção de óxido nítrico através da enzima NOS	Souza, Santos <i>et al.</i> (2007)
<b><i>Himatanthus phageadaenica</i></b>	Triterpenóides	$\alpha$ -amirina; $\beta$ -amirina, lupeol	Ação espasmogênica em musculatura lisa de íleo	Vanderlei, Silva <i>et al.</i> (1991)
	Esteróides	$\beta$ -sitosterol		
	Iridóides	plumericina ( <b>XXI</b> ); alamandina; isoplumericina ( <b>XXI</b> ); ácido $\beta$ -dihidropumericinico ( <b>XXII</b> )		Veloso, Nagem <i>et al.</i> (1999)
	Glucosídios	plumieridio; sacarose		Veloso, Nagem <i>et al.</i> (1999)
			*Anti-helmintica; *Afecções herpéticas; *Úlceras; *Psoríase; *Verrugas	Correa (1984)
			Inibição da diurese; Aumento de glicemia; Aumento da dor; Contrações de musculatura esquelética	Vanderlei e Souza Brito (1989)
			*Anti-helmintica	Azambuja, Campelo <i>et al.</i> (1994)
<b><i>Himatanthus sucuuba</i></b>	Dipsídeos; Iridóides; Terpenóides			Persinos e Blomster (1978); Endo, Hayashi <i>et al.</i> (1994)
	Iridóides	fulvoplumierina; plumericina; isoplumericina	*Gastrite; *Hemorroida; *Anemia; *Artrite; *Verminoses; *Câncer; Ação antineoplásica; Antimicrobiana; Antiflogística; Potentes fungicidas contra <i>Cladosporium sphaerospermum</i> ; Atividade antiinflamatória e analgésica; Ação inibitória para <i>Clostridium histolyticum</i> e <i>Bacterioides fragilis</i>	Perdue e Blomster (1978); Ferrigni, Nelson <i>et al.</i> (1976); De Miranda, Silva <i>et al.</i> (2000); Silva <i>et al.</i> (1998b); Neto, Owens <i>et al.</i> (2002); Silva, Resende <i>et al.</i> (1998)
	Triterpenóides Iridóides	lupeol acetato ( <b>XXIII</b> ); $\alpha$ -amirina cinamato ( <b>XXIV</b> ); lupeol cinamato ( <b>XXV</b> );	*Atividade antiinflamatória; Atividade analgésica	De Miranda, Silva <i>et al.</i> (2000); Silva, Resende <i>et al.</i> (1998)
			Inibidores da enzima monoamino-oxidase B (MAO-B)	Endo, Hayashi <i>et al.</i> (1994)

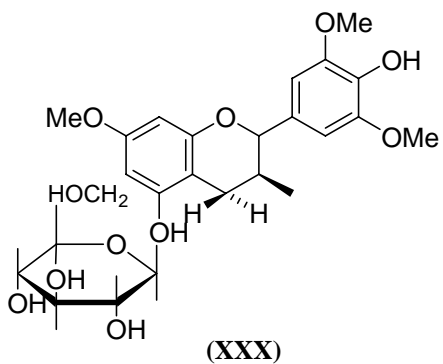
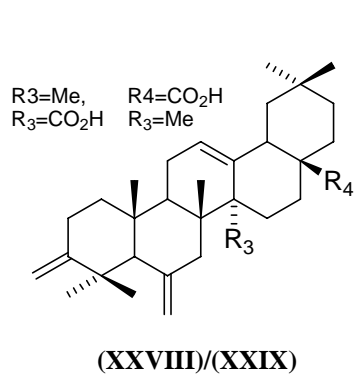
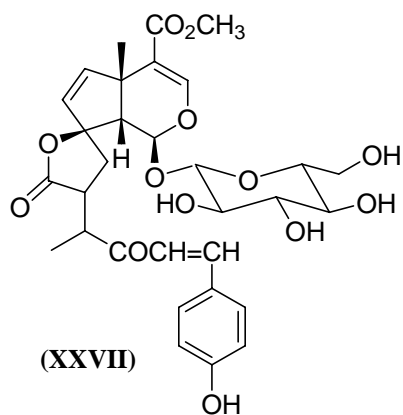
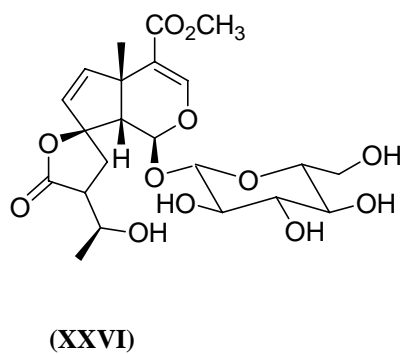
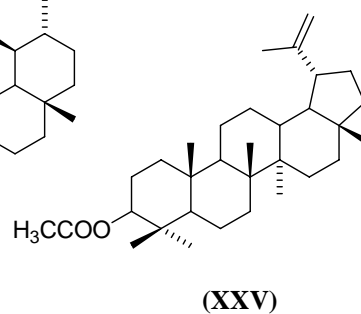
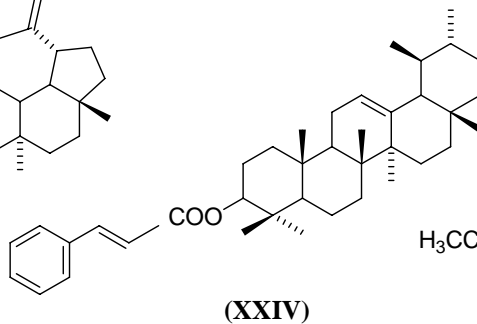
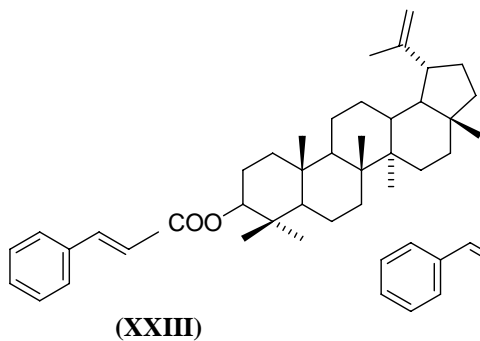
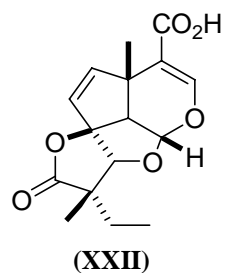
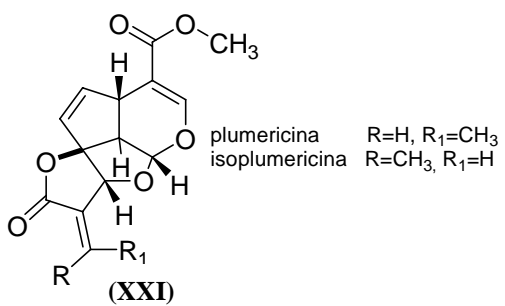
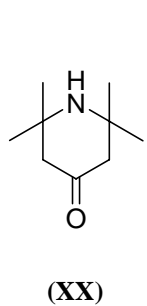
		ácido confluêntico; ácido metilperlatólico	Baixa toxicidade reprodutiva e teratogênica; Gastrite; Hemorroidas	Guerra e Peters (1991)
			Ação sobre a pressão sanguínea; musculatura lisa; permeabilidade capilar; Cicatrizantes	Villegas, Fernandez <i>et al.</i> (1997)
			Atividade antineoplásica em diferentes linhagens celulares	Ribeiro (1998)
			Inibição de linhagens mutantes, devido ação no DNA de reparo	Silva <i>et al.</i> (1998a)
			*Antitumoral; *Antifúngico; *Antianêmico; *Vermífugo; *Tratamento de gastrites e artrites; *Furúnculos; *Edemas; *Laxativo	Fernandes, Fernandes <i>et al.</i> (2000); Di Stasi e Hiruma Lima (2002); Van Den Berg (1982)
			Alucinógena	Luna (1984)
			Antiúlceras; Antitumoral; *Afrodisíaca	Van Der Berg (1984)
<b><i>Plumeria spp</i></b>	Iridóides	plumericina ; isoplumericina; cumarato de plumierina		Peckolt (1870); Adam, Khoi <i>et al.</i> (1979); Coppen e Cobb (1983)
			*Úlceras; *Herpes; *Escabiose; *Purgativa; *Blenorrágica; *Antisifilítico; *Tumores; *Diarréia	Kirtikar e Basu (1935)
<b><i>Plumeria alba</i></b>	Triterpenóides; Cumarinas; Iridóides	ácido ursólico		Rangaswani e Venkata (1960)
	Iridóides	fulvoplumierina; isoplumericina; plumericina; $\alpha$ -amirina acetato; plumierideo ( <b>XXVI</b> ); plumierideo $\rho$ -cumarato ( <b>XXVII</b> )	*Úlceras; *Herpes; *Escabiose; *Purgativa	Bramadhayalaselvam e Jaffer Hussain (1997); Rangaswani e Venkata (1960)
<b><i>Plumeria acutifolia</i></b>	Iridóides	plumenosideo; 13-Deoxiplumierideo; 8-isoplumierideo; 1- $\alpha$ -cafeoilplumierideo		Abe, Chen <i>et al.</i> (1988)

<i>Plumeria bicolor</i>			Ação inibitória para <i>Micrococcus pyogenes</i> var. <i>aureus</i>	Osborne (1943)
<i>Plumeria elegans</i>	Glucosídios	plumeriina	Hemorragia pulmonar	Githens (1949)
<i>Plumeria lancifolia</i>	Iridóides	plumierideo		Albers-Sconberg e Schmid (1961)
	Alcalóides	uleína; demetoxiaspidospermina	*Antiasmática; *Emenagoga; *Purgativa; *Antisifilitica; *Conceptiva	Franca, Brown <i>et al.</i> (2000) Balbach (1974)
			*Febrífuga; *Emenagoga; *Purgativa	Coimbra, 1994
			Estimulante das contrações uterinas; *antiasmática	Acco, Terluk <i>et al.</i> (1996)
			Atividade antiúlceras	Finau, Anguinoni <i>et al.</i> (1996)
<i>Plumeria multiflora</i>	Iridóides	plumericina	Ativa contra fungos e bactérias gram positiva e negativa	Osborne (1943); Little e Johnstone (1950)
			Ativa contra <i>Bacillus subtilis</i> e <i>Aspergillus niger</i>	Florey (1949)
<i>Plumeria obtusa</i>	Glucosídios	plumierideo		Adam, Khoi <i>et al.</i> (1979)
	Triterpenóides Esteróides	ésteres de lupeol; lupeol; lupeol-acetato $\beta$ -sitosterol; estigmasterol; canferol		Schmidt, Khoi <i>et al.</i> (1983)
	Iridóides	6'-O-acetilplumerideo- <i>p</i> -E-cumarato; 6'-O-acetilplumerideo- <i>p</i> -Z-cumarato; plumierideo- <i>p</i> -E-cumarato; plumierideo- <i>p</i> -Z-cumarato; obtusina; ácido obtudílico; $\beta$ -amirina; ácido 3 $\beta$ -27-dihidroxi-urs-12-eno; ácido 3 $\beta$ -hidroxi-urs-30- <i>p</i> -E-hydroxycinamoil-12-em-28-oico		Siddiqui, Naeed <i>et al.</i> (1994); Siddiqui e Begum (1999)
	Triterpenóides Cardiotônicos Cumarinas	oleandrina escopoletina		



<b><i>Plumeria rubra</i></b>	Iridóides	fulvoplumierina, plumierideo		Schmid, Bickel <i>et al.</i> (1952); Kardono, Tsauri <i>et al.</i> (1990); (Albers-Sconberg e Schmid (1961)
	Triterpenóides	ácido 6 $\alpha$ -hidroxi-3-epi-oleanólico (XXVIII); ácido 3 $\alpha$ -27, dihidroxi-olean-12-eno (XXIX)		Akhtar e Malik (1993); Radford, Gillies <i>et al.</i> (1986)
	Cardiotônicos			Kardono, Tsauri <i>et al.</i> (1990)
	Flavonóides	plumerubrosideo (XXX)	Antivirais	Berghe, Leven <i>et al.</i> (1978)
			*Doenças venéreas	Burkill (1966)
			*Reumatismo; *Diarréia; *Blenorragia; *Doenças venéreas; *Hanseaniase	Perry e Metzger (1980)
			*Coceiras	Frear (1948)
<b><i>Plumeria sereicifolia</i></b>	Alcalóides	vincubina (XX)		Cuellar e O'Farril (1976)
		plumerinina		Kazmi (1989)

\*Uso popular

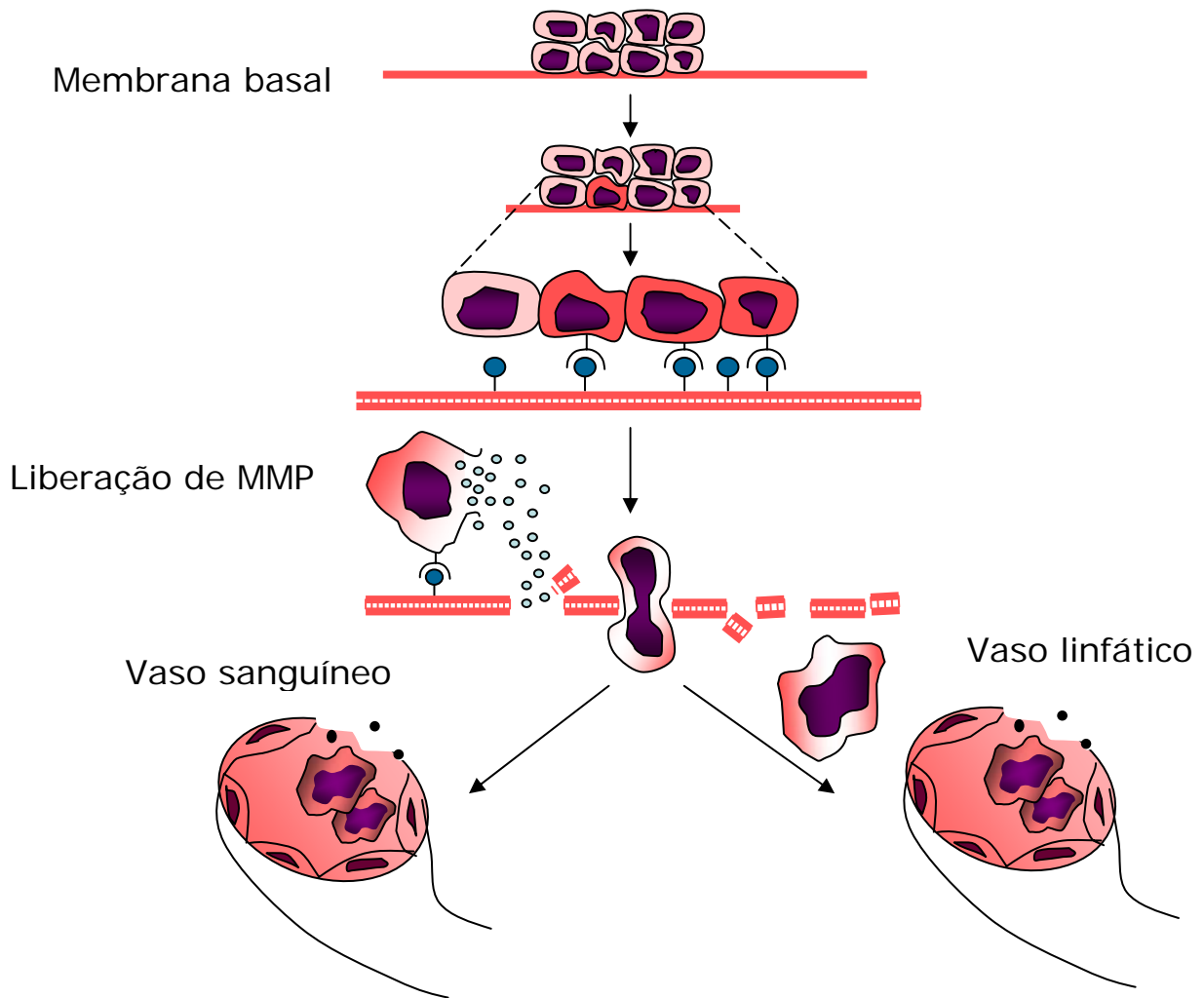


## METÁSTASE

Células malignas possuem a habilidade de se separar do tumor primário, translocar-se para sítios distantes e crescer como colônia secundária em uma nova localização anatômica. Esse processo de estabelecimento do tumor secundário é conhecido como metástase (Fidler e Hart, 1982).

Metástase é processo complexo, no qual envolve uma série de passos e sofre a influência de muitos fatores, o que é um dos maiores obstáculos no tratamento clínico (Fidler e Hart, 1982). A transição do crescimento do tumor *in situ* para doença metastática avançada envolve a habilidade das células tumorais para invadir e atravessar a barreira tecidual (Figura 2). Para iniciar o processo, várias células tumorais penetram na membrana basal epitelial. A adesão das células tumorais na matriz extracelular (MEC), tais como fibronectina, laminina, matrigel é crucial para metástase (Sass, 1998; Syrigos, Harrington *et al.*, 1999) e mostra ser obrigatória para o sucesso da colonização nos órgãos alvos (Nicolson, 1982; Liotta, Rao *et al.*, 1983). Esse processo é seguido pela degradação da MEC proporcionado pela secreção e ativação de enzimas proteolíticas, tais como a matriz de metaloproteinases (MMP) os quais degradam os componentes da matriz extracelular, tais como colágeno tipo IV, glicoproteína e proteoglicanos. Modificações proteolíticas da barreira da matriz são seguidas pela protusão pseudopodial e locomoção das células tumorais. Entretanto, a mobilidade das células tumorais é também um fator importante na metástase do câncer. Angiogênese ou o crescimento de novos vasos sanguíneos a partir dos vasos pré-existent é essencial para dar suporte ao crescimento e progressão, não somente por providenciar um suplemento de sangue necessário, mas também por permitir células metastática de adentrar a circulação (Leek, 2001; Ilson, 2002; Sauer, Deissler *et al.*, 2002). Essa é a causa para muitos da letalidade do câncer.

O aspecto mais maligno do câncer tem sido mostrar a dependência na cascata metastática. Interrupção de alguns desses passos, por um agente, tem o potencial para inibir a expansão maligna e pode ser usado como um agente antimetastático (Mckinnell, 1998).



**Figura 2.** Etapas do processo metastático. As células tumorais multiplicam-se ativamente, tendendo aderir e invadir os tecidos através da secreção e ativação de enzimas proteolíticas, tais como a matriz de metaloproteinases (MMP), atingindo os vasos linfáticos e os vasos sanguíneos.

## INFLAMAÇÃO E RESPOSTA INFLAMATÓRIA

A inflamação é uma resposta local e específica do organismo a uma invasão por determinado agente infeccioso, antígeno, ou ainda por dano físico, químico ou traumático, que necessita ser regulada de forma precisa, uma vez que uma resposta deficiente ou excessiva pode levar a morbidade e mortalidade (Tracey, 2002).

Os organismos vivos, em especial os mamíferos, possuem habilidade inata de defesa própria contra agressões, baseada em quatro elementos: barreira externa, sistema interno inespecífico que reage contra a agressão ou invasores, mecanismo de resposta antigênica específica e integridade das membranas compartimentais (Davies e Hagen, 1997).

A reação fisiológica primária ante a agressão tecidual, seja ela física ou biológica, é a inflamação. A inflamação é resposta celular e humoral de magnitude variável com repercussões meramente locais, loco-regionais ou sistêmicas, cujo disparo é produtor de uma cascata de eventos que envolvem complementos, cininas, fibrinolíticos e coagulantes estimulados, juntamente com a ativação de fagócitos e células endoteliais. Mediada por diferentes mecanismos, ela ocorre em três fases distintas, sendo elas a fase aguda, subaguda retardada e crônica.

Essas três fases são desejáveis e importantes e podem ser consideradas benignas dentro de padrões em que as atividades celulares e dos mediadores permanecem apropriadamente regulados e podem ser identificados por alterações locais notáveis por sinais e sintomas (Santos Junior, 2003).

A reação inflamatória é fenômeno estereotipado, cujos sinais rubor, tumor, calor e dor foram primeiramente descritos por Celsius em 178 A.C. A esses, Galeno (Xu, Gonzalo *et al.*, 1994) adicionou a perda de função. Atualmente, sabe-se que estes sinais são expressões, na

mesma seqüência, da vasodilatação e aumentada permeabilidade da microcirculação possibilitando maior oferta local de nutrientes e de oxigênio, produção energética, extravasamento de líquido para o interstício, provocando o intumescimento e o edema, irritação de terminais nervosos com provocação de dor, sendo conseqüências da liberação de mensageiros fisiológicos químicos encontrados no local da lesão, particularmente, as citocinas (Silva, 1978; Sedgwick e Willoughby, 1985).

As citocinas inflamatórias são substâncias químicas circulantes no plasma e importantes mediadores da resposta vascular e celular desencadeadas pelo estímulo inflamatório. Dentre elas, destacam-se as interleucinas (IL-1, IL-6 e IL-8), fator de necrose tumoral alfa (TNF- $\alpha$ ), fator cólico estimulante (CSFs) e o fator estimulador de colônias de macrófagos e granulócitos (GM-CSF) (Springer, 1994; Springer, 1995; Cassatella, 1995).

No decorrer de um processo infeccioso ou inflamatório, os leucócitos circulantes no sangue periférico aproximam-se da parede vascular ativados por quimiocinas e outros ativadores químicos da inflamação. A produção e expressão desses mediadores e conseqüente migração leucocitária, ocorre em resposta à estímulos antigênicos como bactérias, células lesadas ou frações do complemento, onde então os leucócitos passam a ocupar uma posição mais periférica. Em seguida, aderem-se firmemente, mas de forma transitória, ao endotélio e atravessam a parede do vaso. Após a diapedese, continuam a migrar em direção ao foco inflamatório pelo processo de quimiotaxia (Dekker e Segal, 2000).

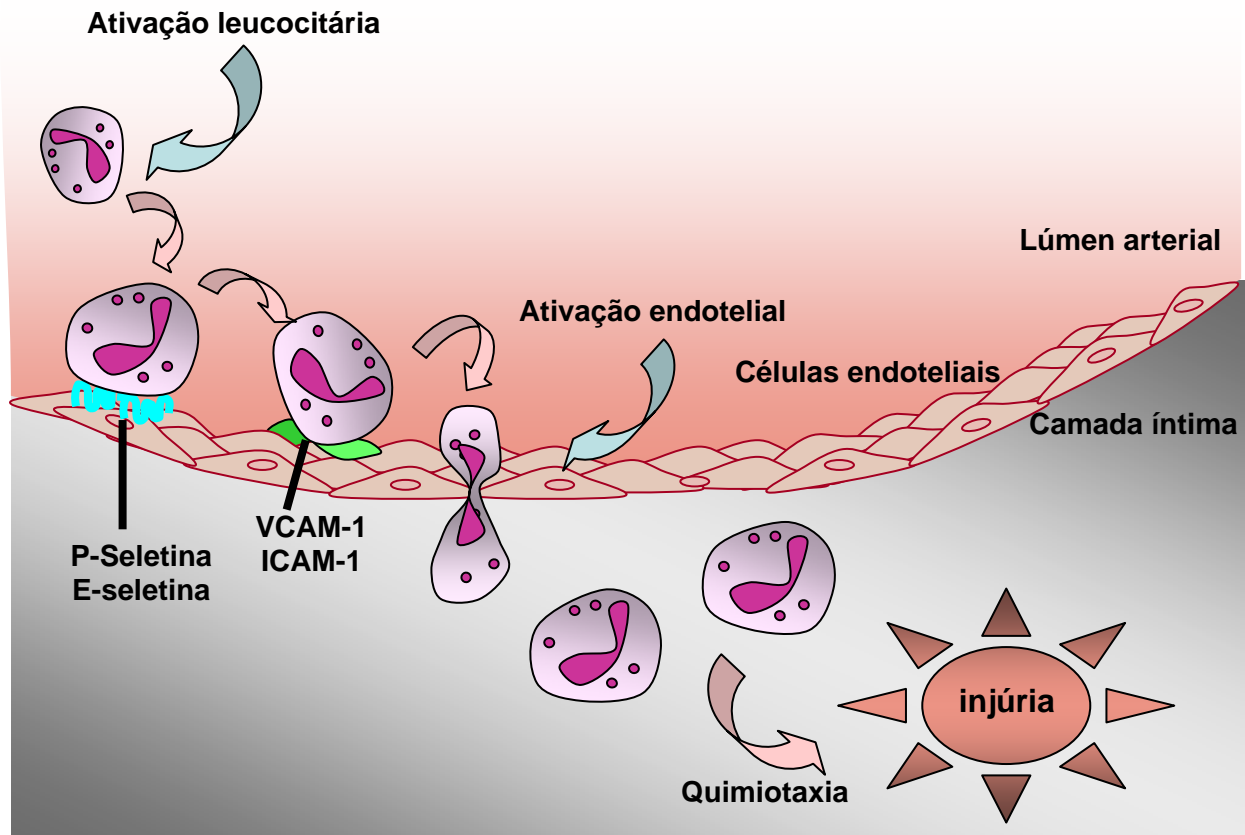
Dessa forma, pelo menos três etapas estão distintamente envolvidas no desenvolver do processo inflamatório: (1) adesão dos leucócitos ao endotélio, (2) sua passagem através do endotélio vascular e (3) migração em direção ao estímulo quimiotático (Dekker e Segal, 2000; Von Andrian e Mackay, 2000). A Figura 3 ilustra, de forma esquemática esses eventos.

Função crítica da inflamação é a migração de células especializadas provenientes do sangue periférico para o tecido conjuntivo no qual se situa o foco inflamatório. Estudos recentes

têm demonstrado que os mecanismos moleculares que recrutam os diferentes tipos de leucócitos para as áreas inflamadas são similares (Von Andrian e Mackay, 2000). Esses experimentos também mostram que a adesão, a transmigração e a locomoção de leucócitos envolvem a ativação, por ligantes específicos, de diferentes famílias de receptores presentes na superfície dessas células e na matriz extracelular (Bokoch, 1995; Dekker e Segal, 2000).

A maioria dos receptores protéicos envolvidos na migração celular pertence à família de receptores associados ao complexo heterotrimérico da proteína G, genericamente denominados metabotrópicos (Rang, Dale *et al.*, 2001), os quais respondem através de uma sucessão de interações e desacoplamentos das subunidades protéicas  $\alpha$ ,  $\beta$  e  $\gamma$  até a associação final com uma enzima-alvo, a qual se torna ativadora de moléculas sinalizadoras, também denominadas mensageiros secundários (Alberts, Bray *et al.*, 1994).

A ativação de receptor, seja qual for a sua família, ou o mecanismo de transdução por ele desencadeado, direciona o comportamento celular e culmina no desencadeamento de uma ou mais atividades celulares, incluindo os mecanismos observados nas respostas inflamatórias como a mobilização de  $\text{Ca}^{+2}$  intracelular (Hallett, Davies *et al.*, 1990), rearranjo do citoesqueleto, exocitose, indução da expressão de receptores de superfície, mudanças na adesão e agregação (Smith, Hollers *et al.*, 1979), indução da produção de superóxidos (Simchowitz e Spilberg, 1979; Thelen, Dewald *et al.*, 1993) aumento da atividade metabólica (Bokoch, 1995), quimiotaxia (Zigmond, 1977), dentre outras como revisado recentemente por Dudez, Chanson *et al.* (2002).



**Figura 3.** Eventos leucocitários na inflamação. Durante o processo inflamatório, os leucócitos, primeiramente rolam, fixam-se transitoriamente e aderem-se ao endotélio vascular, ocorrendo, então, a diapedese seguida da migração em direção aos estímulos quimiotáticos liberados no local da lesão.

## QUIMIOTAXIA LEUCOCITÁRIA

A resposta inflamatória envolve várias etapas com o objetivo maior de recrutar populações celulares distintas, capazes de eliminar o agente causal, com concomitante reparo do tecido lesado. Quando esse processo torna-se exacerbado, ultrapassando os seus efeitos salutares, há a necessidade de se usar agentes que interfiram em uma ou mais dessas etapas (Wilkinson, 1998).

Pesquisas recentes no campo de drogas antiinflamatórias estão direcionadas a favor do desenvolvimento de substâncias potentes com melhor tolerância gastrointestinal e redução de efeitos colaterais. Muitas plantas têm sido utilizadas na medicina tradicional não só pela sua



eficiência em atenuar ou mesmo eliminar os efeitos indesejáveis da resposta inflamatória, mas também pela facilidade de acesso e, principalmente, pelo seu baixo custo.

O deslocamento dos leucócitos da circulação para os tecidos é um passo essencial em todos os tipos de resposta inflamatória. Estudos de locomoção revelam que neutrófilos, eosinófilos, basófilos e fagócitos mononucleares exibem migração direcional sob influência de agentes quimioatratores, embora seja necessário um gradiente de concentração para que ocorra a migração (Lee e Foerster, 1999). Ensaio envolvendo migração de várias populações celulares, tais como os ensaios utilizando filtros são os mais populares e os mais utilizados na identificação de moléculas quimioatratoras, porém não dá nenhuma informação sobre como essas moléculas influenciam na velocidade e na direção do movimento celular (quimiotaxia e quimiotaxia, respectivamente) (Wilkinson, 1998).

## ÓXIDO NÍTRICO

O óxido nítrico (NO) constitui uma das menores e mais simples moléculas biossintetizadas (Morris e Billiar, 1994), considerado um radical livre, gasoso, inorgânico, incolor (Beckman e Koppenol, 1996) é rapidamente inativado pelo oxigênio (Archer, 1993) ou superóxido dismutase (Gryglewski, Palmer *et al.*, 1986). Sua meia vida é curta e a especificidade de suas reações é mínima (Nathan, 1992). O interesse pelas funções biológicas do NO foi conseqüente ao desfecho, praticamente simultâneo, de três linhas de pesquisa, absolutamente independentes, que culminou com um ponto comum, o envolvimento dessa molécula no processo em questão (James, 1995).

A primeira linha de pesquisa constava da investigação do papel do endotélio vascular no processo de relaxamento do vaso sanguíneo. Furchgott e Zawadzki (1980) concluíram que a ação

de alguns vasodilatadores, como a acetilcolina, era inteiramente dependente da presença do endotélio intacto e envolvia a liberação de um fator essencial para o relaxamento vascular (EDRF). Rapoport e Murad (1983) propuseram que o mecanismo pelo qual o EDRF causava o relaxamento vascular era mediado pela guanosina monofosfato cíclica (GMPc). Estudos detalhados da ação biológica nos vasos e nas plaquetas demonstraram que essa substância era idêntica ao NO (Ignarro, Byrns *et al.*, 1987; Palmer, Ferrige *et al.*, 1987; Radomski, Palmer *et al.*, 1987; Moncada, Radomski *et al.*, 1988) sendo indistinguíveis na atividade biológica, estabilidade química e susceptibilidade à inibidores ou potencialização e que ambos tinham sua ação inibida pela hemoglobina e por superóxido dismutase. Porém, Ignarro (1990) alegou que a forma ativa do EDRF não era o NO, mas um precursor do NO ou um tiol derivado do NO.

A segunda linha de pesquisa tratava da questão da produção de óxidos de nitrogênio pelos mamíferos. Schmidt e Walter (1994) relataram que a quantidade eliminada dessas substâncias excedia a quantidade ingerida. Snyder e Bredt (1992) citaram que o organismo humano era capaz de converter nitrato ( $\text{NO}_3^-$ ) e nitrito ( $\text{NO}_2^-$ ) da dieta em nitrosaminas carcinogênicas, após reação do  $\text{NO}_2^-$  com aminas.

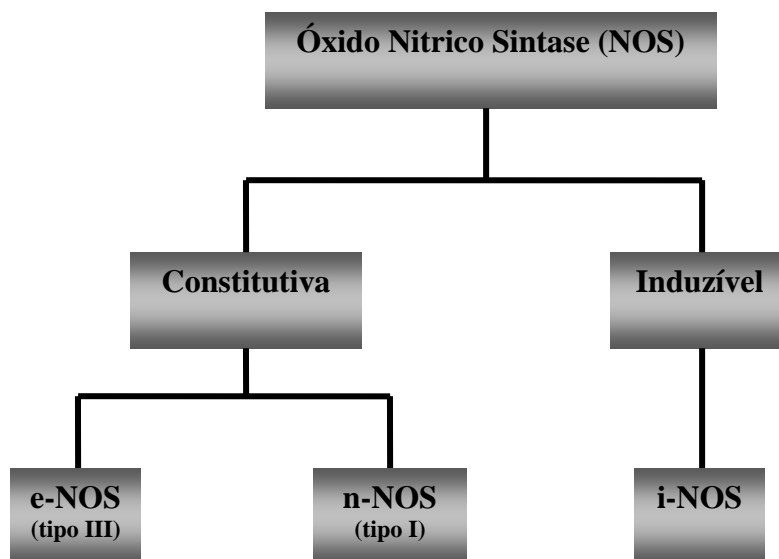
A última linha de pesquisa referida estava associada à investigação do mecanismo de ação de neurotransmissores. Ferrendelli, Chang *et al.* (1974) demonstraram que o glutamato, um conhecido neurotransmissor, provocava aumento de GMPc no sistema nervoso central. Miki, Kawabe *et al.* (1977) demonstraram a ativação da guanilato ciclase cerebral pelo NO.

O desfecho comum dessas três linhas de pesquisa fez com que o NO passasse da condição de molécula sem importância biológica e pouco estudada para a de um dos mais importantes mediadores de processos intra e extracelulares, sendo escolhido como a molécula do ano de 1992 (Gryglewski, Palmer *et al.*, 1986).

## Síntese e inibição

Nas células do endotélio vascular, assim como em várias outras células, a síntese do NO resulta da oxidação de um dos dois nitrogênios guanidino da L-arginina, que é convertida em L-citrulina. Essa reação é catalizada pela enzima NO-sintase (NOS) (Marletta, 1994; Moncada, Palmer *et al.*, 1991). Uma variedade de isoformas de NOS têm sido purificada, os quais podem agrupar em duas categorias, a NOS constitutiva (c-NOS), dependente de íons  $\text{Ca}^{+2}$  e calmodulina, que está envolvida na sinalização celular, e a NOS induzível (i-NOS), produzida por macrófagos e outras células ativadas por citocinas (Moncada, Palmer *et al.*, 1991).

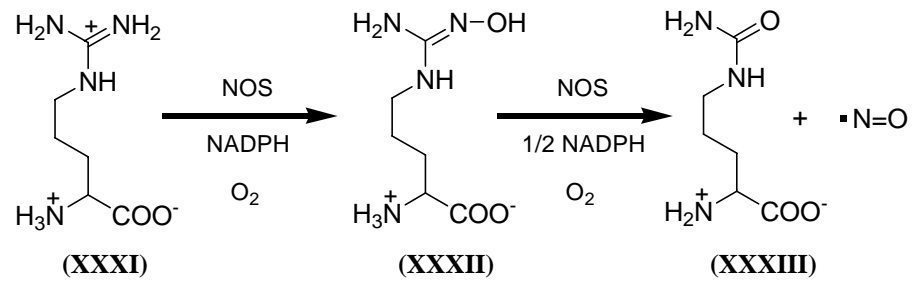
A c-NOS e a i-NOS diferem quanto ao peso molecular, à forma de ativação e à capacidade de síntese de NO (Marletta, 1994). A isoforma constitutiva compreende a NOS neuronal (n-NOS, tipo I), presente normalmente nos neurônios (Bredt e Snyder, 1989), e a NOS endotelial (e-NOS, tipo III), presente nas células endoteliais vasculares (Moncada, Palmer *et al.*, 1991) e nas plaquetas (Radomski, Palmer *et al.*, 1990), conforme esquematizada na Figura 4.



**Figura 4.** Isoformas da enzima NO-sintase.

A c-NOS produz pequenas quantidades de NO e sua ativação depende da interação com a calmodulina, que por sua vez, é controlada pela concentração de  $\text{Ca}^{+2}$  (Moncada, Palmer *et al.*, 1991). A i-NOS não é expressa sob condições normais, é induzida por citocinas e/ou endotoxinas em uma variedade de células, incluindo macrófagos, linfócitos T, células endoteliais, miócitos, hepatócitos, condriócitos, neutrófilos e plaquetas (Moncada, Palmer *et al.*, 1991; Marletta, 1994) e, uma vez sintetizada, liberam quantidades maiores de NO, não sendo regulada por cálcio (Dusting e Macdonald, 1995).

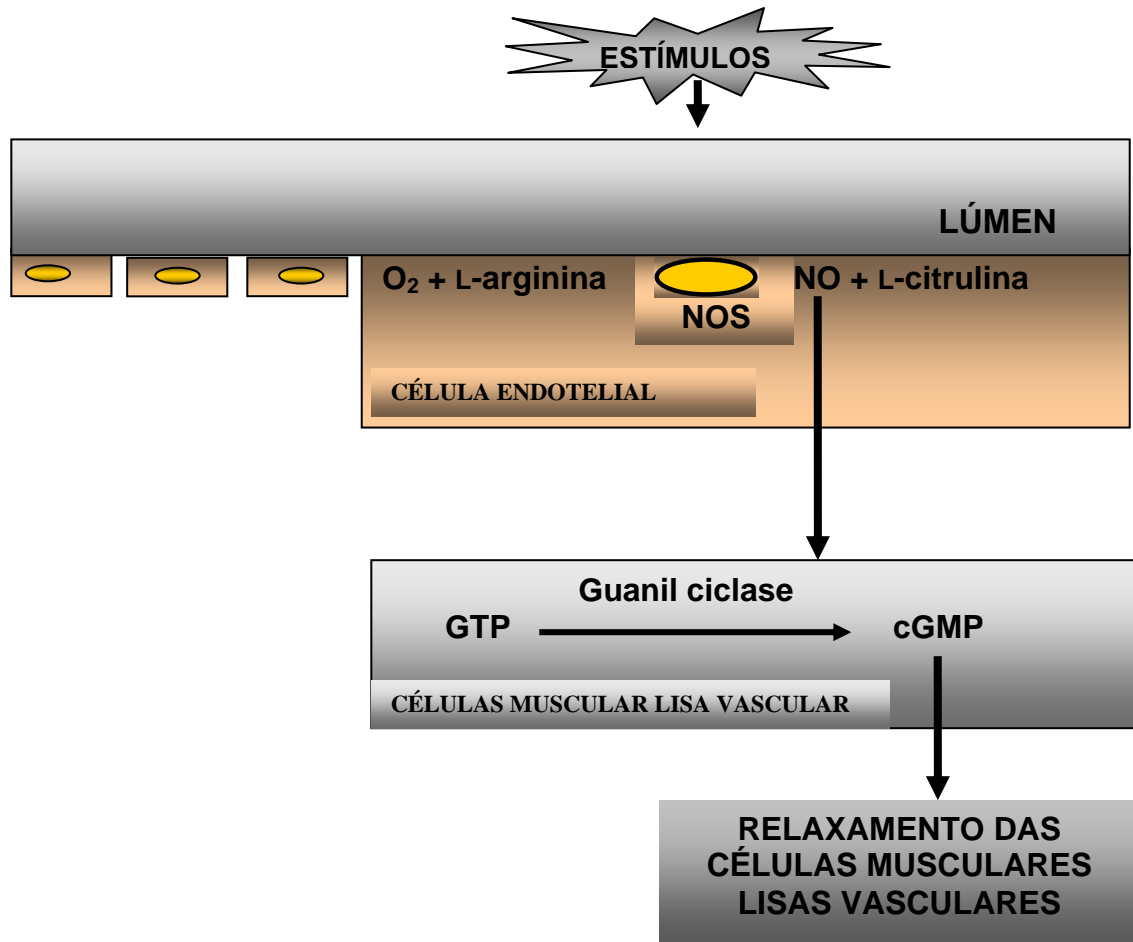
A síntese de NO, envolve duas etapas (Figura 5). Na primeira, ocorre a hidroxilação de um dos nitrogênios guanidinos da L-arginina (**XXXI**) para gerar o N-hidroxi-L-arginina (NHA) (**XXXII**). Esta reação utiliza NADPH e oxigênio e, provavelmente, envolve o complexo heme da NOS. Na segunda etapa, ocorre a conversão da NHA em L-citrulina (**XXXIII**) e NO.



**Figura 5.** Reação catalizada pela NO-sintase.

### NO produzido pela e-NOS

O NO produzido pelas células endoteliais atravessa o espaço do endotélio para o músculo liso vascular e estimula diretamente a enzima guanilil ciclase solúvel e a conseqüente formação de cGMP intracelular (monofosfato cíclico de guanosina), resultando no relaxamento das células da musculatura lisa vascular (Figura 6). A interação do NO com a guanilil ciclase solúvel provoca muitos efeitos fisiológicos e patofisiológicos (Lyons, 1995).



**Figura 6.** Mecanismo de vasodilatação mediado pelo óxido nítrico (NO), em resposta a vários estímulos. A enzima óxido nítrico sintase (NOS) utiliza oxigênio molecular e o aminoácido L-arginina para formar o NO, que ativa a guanilil ciclase nas células da musculatura lisa vascular, aumentando o nível de monofosfato cíclico e guanosina (cGMP), produzindo relaxamento e vasodilatação.

Quando o cGMP está alto, o cálcio intracelular diminui, relaxando a célula e a vasodilatação se desenvolve. A vasodilatação se mantém enquanto a difusão do NO para musculatura lisa vascular estiver ocorrendo. Um aumento no fluxo de NO para a musculatura lisa vascular provoca maior relaxamento celular e maior vasodilatação. Se a formação de NO diminui, reduzindo as concentrações de cGMP celular, interrompe a defosforilação e ocorre uma vasoconstrição moderada. O efeito vasodilatador do NO parece ser mantido por estímulos físicos do fluxo pulsátil e força de cisalhamento nas células endoteliais vasculares (Wong e Marsden,

1996). O NO que deixa a célula endotelial em direção à corrente sanguínea pode penetrar nas plaquetas, especialmente nas que se encontram justapostas à parede do vaso ou nas hemáceas (Wolin, 2000). Atualmente, está bem estabelecido que o NO resultante da e-NOS tem um papel crucial na proteção do vaso sanguíneo. Esta ação está associada à manutenção do tônus vascular (Nava e Luscher, 1995; Wennmalm, 1994), regulação da pressão sanguínea (Wennmalm, 1994), prevenção da agregação plaquetária (Vasta, Meacci *et al.*, 1995), inibição da adesão de monócitos e neutrófilos ao endotélio vascular (Kubes, Suzuki *et al.*, 1991), efeito antiproliferativo (Gewaltig e Kojda, 2002) e antioxidativo (Wolin, 2000).

## NO produzido pela i-NOS

O NO resultante da ativação da i-NOS possui ação citotóxica e citostática, promovendo a destruição de microrganismos, parasitas e células tumorais. A citotoxicidade do NO resulta da sua ação direta ou da sua reação com outras substâncias liberadas durante o processo inflamatório. A base bioquímica para a ação direta do NO consiste na sua reação com metais presentes nas enzimas do seu alvo (James, 1995). Desta forma, são inativadas enzimas cruciais para o ciclo de Krebs, para a cadeia de transporte de elétrons, para a síntese de DNA e para o mecanismo de proliferação celular.

Um aspecto a ser considerado sobre as plantas do gênero *Himatanthus*, uma planta oficialmente descrita na Farmacopéia Brasileira I, é que, embora a literatura seja farta com referência às suas constituições químicas, pouco se sabe sobre as propriedades biológicas dessa planta e seus respectivos mecanismos de ação. Portanto, a possibilidade de se realizar estudos que pudessem avaliar essas propriedades e relacioná-las ao seu uso popular tornou esse trabalho bastante atraente e gratificante, haja vista que não era nosso objetivo original. O conjunto desses

estudos contribuirá, em parte, para o entendimento das bases científicas pela qual essa planta é tão utilizada na medicina tradicional, somadas ainda à possibilidade, no futuro, do desenvolvimento de novos medicamentos de origem sintética ou semi-sintética.



## OBJETIVOS

---

### OBJETIVOS GERAIS

O presente trabalho objetivou o estudo dos constituintes e das atividades biológicas dos alcalóides indólicos e substâncias isoladas das cascas de *Himatanthus lancifolius* (Muell. Arg.) Woodson, Apocynaceae.

### OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Proceder ao isolamento e elucidar a estrutura das substâncias do metabolismo secundário (alcalóides indólicos) e/ou outros constituintes químicos;
- Avaliar os efeitos biológicos e o mecanismo de ação dos alcalóides isolados e frações da agoniada em musculatura lisa vascular, não vascular e esquelética de ratos;
- Avaliar a toxicidade aguda da FAA e das substâncias isoladas;
- Avaliar a interferência dos alcalóides isolados da agoniada na migração leucocitária (quimiotaxia) *in vitro* e *in vivo*;
- Avaliar *in vitro* a atividade antioxidante da FAA e das substâncias isoladas;
- Avaliar a atividade antimicrobiana da fração apolar, fração de alcalóides da agoniada e substâncias isoladas contra patógenos humanos gram positivos e gram negativos, incluindo cepas caninas;
- Mensurar a produção de óxido nítrico em células endoteliais de aorta de coelho (RAEC) e células de melanoma de camundongo (B16F10);
- Avaliar a atividade das substâncias isoladas na viabilidade e na adesão celular de células B16F10 e RAEC.

## EXPERIMENTAL

---

### MATERIAL BOTÂNICO

Cascas de *Himatanthus lancifolius* foram adquiridas no mercado formal de plantas medicinais na região metropolitana de São Paulo (15 kg) em junho de 2002 e a identificação da espécie foi feita através da análise farmacognóstica no próprio Laboratório de Farmacognosia da UFPR, segundo a Farmacopéia Brasileira I, por estudos microscópicos e também por comparação macroscópica com amostras autênticas contidas na herboteca desse mesmo laboratório. Foi depositada amostra da droga na herboteca do Laboratório de Farmacognosia da UFPR (sem número de registro), onde permanece como material de referência e estudo.

O material botânico adquirido foi seco em estufa a 40 °C e triturado a pó, sendo previamente desengordurado em aparelho de soxhlet, usando como solvente o *n*-hexano por 4 h, para retirada de lipídeos e diversas outras substâncias apolares. Essa etapa foi fundamental para evitar problemas como formação de emulsão durante o processo de partição, visto que o material da planta contém quantidades substanciais de componentes apolares. A fração apolar foi checada quanto à presença de alcalóides usando reativo de Dragendorff<sup>1</sup>. As cascas após limpas, moídas e desengorduradas pesaram 12,6 kg.

---

<sup>1</sup> Foi dissolvido 0,85 g de nitrato de bismuto básico em 10 ml de ácido acético glacial e 40 ml de água sob aquecimento. Essa solução foi filtrada (Solução A). Foi dissolvido 8 g de iodeto de potássio em 30 ml de água (Solução B). As soluções A e B foram misturadas na proporção de 1:1 (Solução estoque). Foi misturado 1 ml da Solução estoque com 2 ml de ácido acético glacial e 10 ml de água (Solução spray).

## TRIAGEM FITOQUÍMICA

Para obter informações sobre os grupos de metabólitos produzidos por *H. lancifolius* – Apocynaceae foram feitos os testes de triagem segundo Evans (1996) e Caetano, Duarte *et al.* (1996), utilizando 15 g do pó das cascas secas, moídas e desengorduradas.

## MÉTODOS ESPECTROMÉTRICOS E CROMATOGRÁFICOS

Os espectros de ultravioleta (UV) foram obtidos em espectrômetro Shimadzu UV 1601 com cubetas de sílica fundida de 1 cm de espessura. Os espectros de infravermelho (IR) foram gerados em espectrômetro Perkin Elmer P-E 1710 FT-IR em pastilhas de KBr.

Os espectros de CG-EM foram obtidos em cromatógrafo gasoso Varian Satur, modelo 2000-R com coluna capilar J & B, DB 225, 30 m, 0,25 mm, cianopropilfenilmetiloxano como fase estacionária e cromatógrafo gasoso HP 6890 utilizando coluna capilar de fenilmetilsiloxano como fase estacionária.

Os cromatogramas de CLAE foram obtidos em cromatógrafo Prostar 410 Autosampler, Prostar 335 PDA, coluna C 8, com fluxo de 0,8 ml/min e absorvância de 305 nm.

As determinações dos pontos de fusão foram realizadas em microscópio adaptado com bloco de platina de Kofler, sem correção e aparelho Buchi SMP-20 com correção.

Os espectros de RMN  $^1\text{H}$  foram obtidos em espectrômetro Varian Inova 400 de 400 MHz e em  $\text{CDCl}_3$ . As posições ou os centros dos multipletos são dados na escala  $\delta$  com referência ao tetrametilsilano (TMS) como padrão interno. Os espectros de RMN  $^{13}\text{C}$  foram adquiridos em espectrômetro Bruker DRX 400 de 400 MHz.

Os espectros de massas foram obtidos em espectrômetro Kratos Concept, usando ionização elétrica (EI) e química (CI). As fórmulas moleculares foram determinadas a partir de medida de massa de precisão.

A atividade ótica foi determinada em polarímetro AA-100 Optical Activity.

As cromatografias em camada delgada analítica foram feitas em placas de sílica Merck pré-ativadas com fase estacionária sílica gel 60 F<sub>254</sub> visualizadas em lâmpada de UV e reveladas em solução de sulfato cérico amoniacal<sup>2</sup> seguido de aquecimento a 100 °C e reativo de Dragendorff. Foram utilizados vários solventes como fase móvel, de diferentes polaridades e proporções e suas relativas mobilidades foram expressas pela convenção R<sub>f</sub> (Wagner, 1995).

As cromatografias em coluna (21 mm x 450 mm e 4 mm x 125 mm) foram realizadas sobre sílica-gel 60G (70-230 mesh) e (230-400 mesh) Merck, usando escala eletrônica de solventes para fase móvel. Para cromatografias preparativas foram utilizadas placas de sílica gel 60 F<sub>254</sub> Merck pré-montadas em suporte de vidro, com espessura de camada de 250 µm.

Solventes e reagentes foram purificados antes do uso, por meio de métodos padrões (Perrin, Amarego *et al.*, 1966) e foram utilizados também solventes com grau HPLC.

Unidades e símbolos estão baseados no Système Internationale d'Unités (SI) de acordo com a recomendação da IUPAC.

---

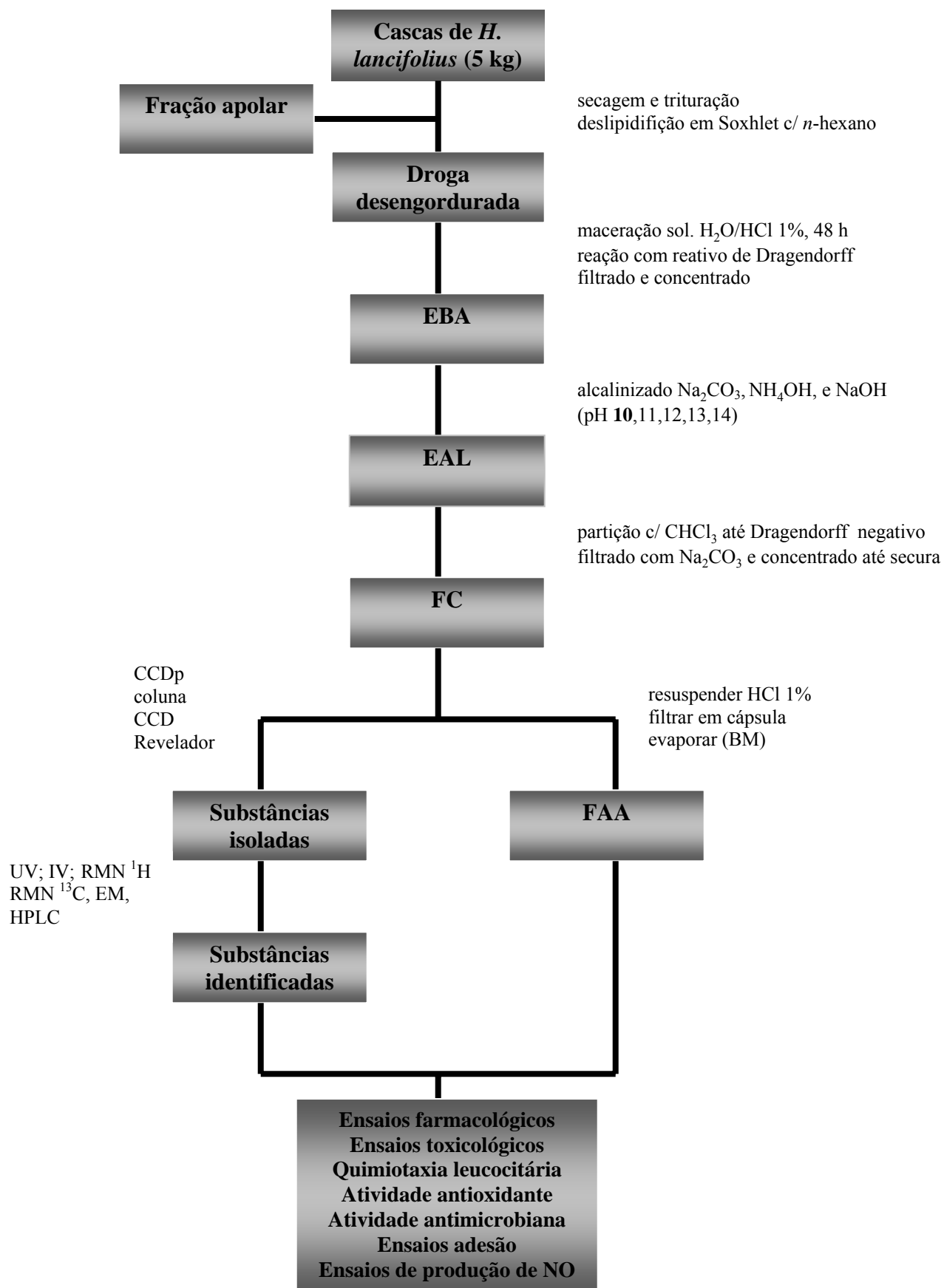
<sup>2</sup> Solução saturada de sulfato cérico em ácido sulfúrico 10%.

## ISOLAMENTO QUÍMICO

### Extração de alcalóides - Método A

Cascas secas e pulverizadas de *Himatanthus lancifolius* (5 kg) previamente desengorduradas com *n*-hexano (500 ml) foram maceradas por 48 h em solução aquosa de ácido clorídrico 1% (v/v) e extraída até exaustão (30 litros), comprovada com reação negativa frente ao reativo de Dragendorff. O macerado obtido foi filtrado em papel de filtro e concentrado em rotaevaporador e Banho Maria até 1/5 do volume inicial (6 litros). Parte do extrato (2,5 litros) foi fracionado em aliquotas de 500 ml e alcalinizado separadamente com carbonato de sódio, amônia e hidróxido de sódio, obtendo gradientes crescentes de pH (10, 11, 12, 13 e 14) para as respectivas alíquotas medido em pHmetro modelo pH 21. Para diferenciar as frações obtidas, convencionou-se adotar as siglas FAA pH10, FAA pH11, FAA pH12, FAA pH13 e FAA pH14, embora essas frações não apresentem esses respectivos pH para análise biológica, haja vista que as frações foram isoladamente particionadas com clorofórmio até exaustão com reação negativa frente ao reativo de Dragendorff e evaporada sob pressão reduzida, obtendo como resultados 4,02 g (pH10), 3,78 g (pH11), 3,64 g (pH12), 3,02 g (pH13) e 2,83 g (pH14). Essas frações foram novamente ressuspensas em solução aquosa de ácido clorídrico 1% e biologicamente avaliadas (Esquema 7).

O restante do extrato aquoso acidificado HCl 1% (3,5 litros) foi alcalinizado até pH10 medido em pHmetro usando carbonato de sódio e sucessivamente particionado com clorofórmio até reação negativa frente ao reativo de Dragendorff e evaporado sob pressão reduzida, obtendo como resultado 24,03 g de extrato. Parte dessa fração foi utilizada no fracionamento e isolamento dos alcalóides.



**Esquema 7.** Processo de extração, partição, isolamento e identificação dos metabólitos secundários das cascas de *H. lancifolius* pelo método A.

## Fracionamento e isolamento dos alcalóides

Uma porção da fração de alcalóides pH10 (3 g) foi cromatografada em coluna (21 mm x 450 mm) de sílica gel 70-230 mesh (60 g) e eluída com um gradiente de hexano, hexano:tolueno, tolueno, tolueno:diclorometano, diclorometano, diclorometano:clorofórmio, clorofórmio, clorofórmio:acetona, acetona, acetona:etanol e etanol. Desse fracionamento foram obtidas 475 frações, que foram submetidas à CCD (fase móvel: *n*-hexano: acetato de etila: metanol: dietilamina 5:4:0,8:0,2) revelada com reativo de Dragendorff e sulfato cérico amoniacal seguida por aquecimento. As frações com mesmos perfis cromatográficos foram combinadas rendendo 33 frações denominadas U1 até U33. As frações U12 – U20 foram novamente reunidas, cromatografadas em coluna (4 mm x 125 mm) de sílica gel 60 70-230 mesh (30 g) e eluída com diclorometano, diclorometano:metanol e metanol rendendo 160 frações. As frações 74 a 79 foram reunidas, o qual rendeu a fração R1D. A fração R1D foi submetida a uma placa preparativa em sílica gel (20 cm x 20 cm) usando como fase móvel *n*-hexano: acetato de etila: metanol: dietilamina (5:4:0,8:0,2) rendendo quatro manchas bem definidas, denominadas R1D1, R1D2, R1D3 e R1D4. A fração R1D1 foi cromatografada em CCDp em sílica gel (10 g) usando como solvente clorofórmio: metanol (99,5:0,5), onde foram obtidos 0,102 g ( $\eta=0,0035\%$ ) de uma substância pura cristalizada denominada **AL1** ( $R_f 0,37$ ). Não existem quantidades suficientes das outras manchas observadas para promover os testes espectrométricos, mas essas foram guardadas separadamente.

Uma porção da fração de alcalóides da agoniada pH10 (5 g) foi cromatografada em coluna de sílica gel 70-230 mesh (100 g) e eluída com um gradiente de tolueno, tolueno: diclorometano, diclorometano, diclorometano:clorofórmio, clorofórmio, clorofórmio:acetato de etila, acetato de etila, acetato de etila:etanol e etanol. Desse fracionamento foram obtidas 158

frações, que foram submetidas à CCD (fase móvel: *n*-hexano: acetato de etila: metanol: dietilamina 5:4:0,8:0,2) revelada com reagente de Dragendorff e sulfato cérico amoniacal seguida por aquecimento. As frações com mesmos perfis cromatográficos foram combinadas rendendo treze frações denominadas FA (fração 1-15), FB (16-32), FC (33-48), FD (49-56), FE (57-70), FF (71-80), FG (81-90), FH (91-100), FI (101-106), FJ (107-108), FK (109-118), FL (119-128) e FM (129-158). As frações FC e FD foram reunidas, evaporadas à temperatura ambiente, onde foram obtidos 0,2251 g ( $\eta=0,0041\%$ ) de uma substância impura. Essa substância foi submetida a uma placa preparativa em sílica gel (20x20 cm) usando como fase móvel *n*-hexano: acetato de etila: metanol: dietilamina (5:4:0,8:0,2) rendendo duas manchas bem definidas que foram raspadas e cromatografadas em coluna de sílica gel (10 g) usando como solvente clorofórmio:metanol (99,5:0,5), onde foram obtidos 0,1421 g ( $\eta=0,0028\%$ ) de uma substância pura denominada **AL4** ( $R_f$  0,37) apresentando o mesmo perfil cromatográfico da substância **AL1** anteriormente isolada e 0,063 g ( $\eta=0,0012\%$ ) de uma outra substância denominada **AL3** ( $R_f$  0,34). Essas substâncias foram quimicamente e biologicamente avaliadas.

As frações FA-FB foram reunidas e cromatografadas em sílica gel 60 70-230 mesh (30 g) e eluída com solvente de polaridade crescente, como *n*-hexano, *n*-hexano:acetato de etila, acetato de etila, acetato de etila:etanol e etanol rendendo 251 frações. A fração M1 (frações 24-32) foi reunida por apresentar o mesmo perfil cromatográfico, o qual rendeu a fração M1A. A fração M1A foi cromatografada em coluna (4 mm x 125 mm) de sílica gel 60 70-230 mesh (30 g) e eluída com solvente de polaridade crescente de hexano, hexano:acetato de etila e acetato de etila, rendendo 24 frações. A fração 20 foi seca à temperatura ambiente, ressuspensionado com clorofórmio e filtrado a vácuo, onde foram obtidos 0,0273 g ( $\eta = 0,0054\%$ ) de uma substância pura denominada **AL2** ( $R_f$  0,65) e encaminhada para proceder às análises espectrométricas.



Uma nova coluna (4 mm x 125 mm) empacotada com sílica gel 60 70-230 mesh (30 g) foi montada utilizando-se as frações 13-23 da fração M1, o qual foi eluída com *n*-hexano, *n*-hexano:acetato de etila e acetato de etila rendendo 225 frações. As frações 14 a 48 foram reunidas por apresentar cristalização e, após serem submetidas a uma placa preparativa, isolou-se 0,0675 g ( $\eta = 0,0013\%$ ) da substância **AL2** ( $R_f$  0,65) anteriormente isolada. Essa substância foi biologicamente avaliada.

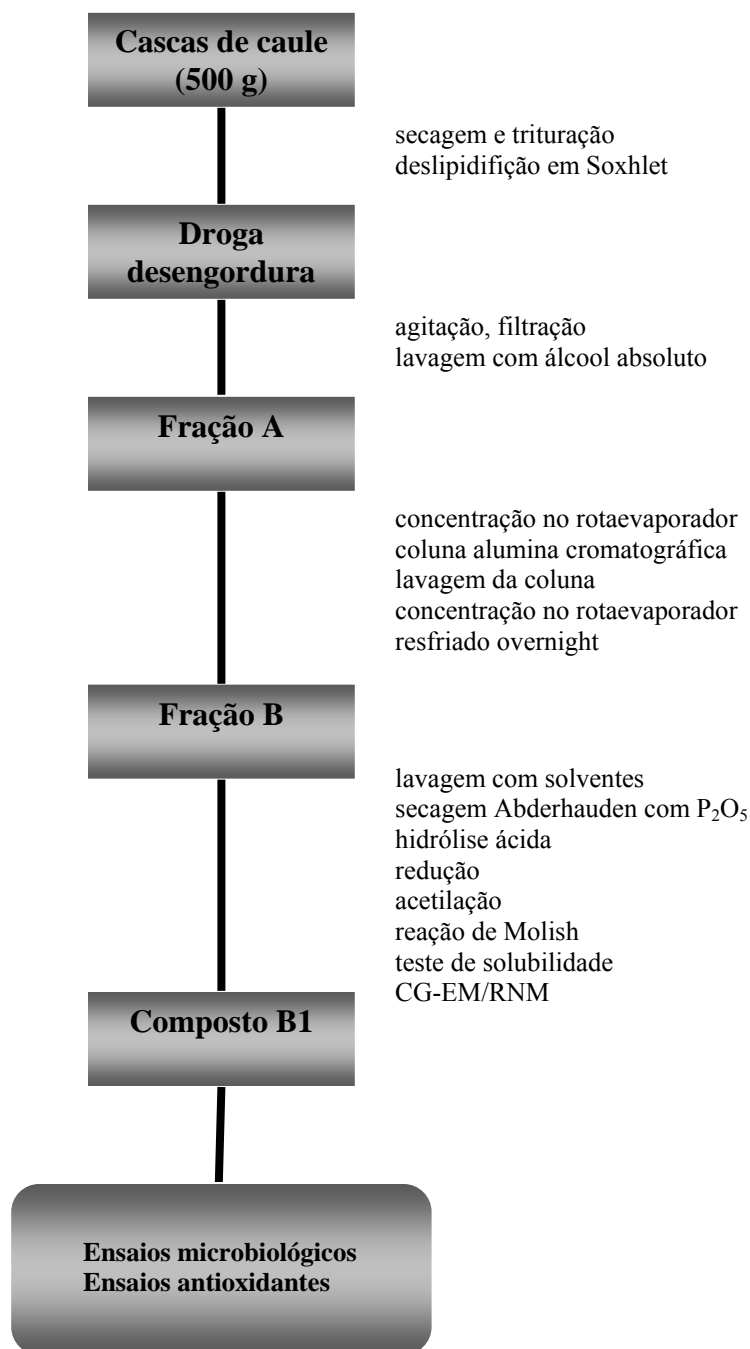
### Purificação dos alcalóides isolados

As substâncias isoladas foram submetidas à cuidadosa cromatografia em coluna, eluindo-se com clorofórmio e metanol (99,5:0,5) e submetidos a várias recristalizações com o mesmo eluente. As substâncias foram desidratadas em secador Abderhalden, na presença de pentóxido de fósforo ( $P_2O_5$ ) por 4 h e submetidas à análise espectroscópica.

### Extração de substâncias - Método B

Cascas de *H. lancifolius* seca, moída e desengordurada (500 g) foram submetidos à agitação mecânica constante durante 2 h em etanol (2,5 litros) e após filtração por papel de filtro o resíduo lavado com álcool absoluto (1 litro). O extrato foi concentrado em rotaevaporador até 1,5 litros (Fração A). Essa Fração foi eluída em coluna de 6 cm de diâmetro, utilizando como fase estacionária alumina cromatográfica, e a coluna novamente lavada com álcool absoluto (100 ml). O percolato foi concentrado em rotaevaporador até atingir 200 ml (Fração B) e deixado na geladeira em repouso por um período de 12 h a 4 °C. O resíduo **B1** sólido formado no percolato (2,4819 g) foi filtrado e lavado em funil de Buchner com *n*-hexano, clorofórmio e etanol,

respectivamente, e secos no Abderhuden na presença de  $P_2O_5$ , pesando após lavagem com os solventes e secagem 2,1513 g ( $\eta=0,42\%$ ). A substância B1 foi encaminhada para os ensaios espectrométricos e biológicos. O processo de extração, isolamento e identificação da substância isolada está descrito no Esquema 8.



**Esquema 8.** Processo de extração, isolamento e identificação de substâncias das cascas de *H. lancifolius* pelo método B.

## Hidrólise ácida total da substância B1

Aproximadamente 50 mg da substância B1 foram hidrolisadas com ácido trifluoracético (1 ml, 2 mol/l, 100 °C, 5 h). A substância resultante foi filtrada em algodão e deixado em capela à temperatura ambiente até evaporação do TFA (Adams e Young, 1965).

## Redução

O açúcar obtido a partir da hidrólise ácida da substância B1 foi ressuspenso em água destilada e reduzido com  $\text{NaBH}_4$  até a solução apresentar pH 9 (2 h, 25 °C). Os íons  $\text{Na}^+$  presente nas amostras, foram removidos pela permeação em resina catiônica (Lewattit S-100). As frações obtidas foram evaporadas até secar em rotaevaporador (65 °C) e o ácido bórico formado foi removido pela adição de metanol na forma de borato de tetrametila, substância volátil eliminada em rotaevaporador (40 °C) (Wolfrom e Thompson, 1963).

## Acetilação

As substâncias formadas foram tratadas com anidrido acético e piridina (1:1) em recipientes fechados (8 h), extraídos com  $\text{CHCl}_3$ . A piridina foi eliminada pela complexação com o cobre. Para isto, foi utilizada uma solução 5% de  $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$  (Wolfrom e Thompson, 1963).

## Análise por CG-EM e RMN $^{13}\text{C}$

Os acetatos formados foram analisados em CG-EM modelo Varian Satur 2000 R, utilizando coluna capilar J & W, DB 225, 30 m, 0,25 mm, com filme de fase estacionária cianopropilfenil (50%) – metilpolisiloxane. Condições analíticas: He como gás carreador, temperatura inicial 50 °C e final 250 °C, rampa de aquecimento 40 °C/min.

Os espectros de RMN  $^{13}\text{C}$  da substância B1 foram adquiridos em espectrômetro Brucker DRX 400 de 400 MHz.

## ENSAIOS FARMACOLÓGICOS

Parte da fração de alcalóides da agoniada concentrada no rotaevaporador foi resuspenso em solução de ácido clorídrico 1% e filtrado (Esquema 7). O sal formado (cloridrato) foi utilizado para a realização dos ensaios farmacológicos. Os alcalóides isolados também foram submetidos a esses ensaios.

Os testes farmacológicos específicos propostos e descritos a seguir, foram realizados devido a indicações dos resultados preliminares obtidos com a fração alcaloídica da agoniada (FAA) por Rattmann, Terluk *et al.* (2005).

## ENSAIOS BIOLÓGICOS *IN VIVO*

### Toxicidade aguda da FAA e substâncias isoladas

Foram usados camundongos albinos (20-30 g), mantidos em jejum por 18 h e água *ad libitum*, divididos em cinco grupos de animais. No total de dez camundongos por grupo foram administradas várias concentrações de FAA por via intraperitoneal (0,25 a 1,5 g/kg), via oral (0,2 a 10 g/kg) e também doses das substâncias isoladas AL1 e AL2 (0,1 – 1,0 mg/g), intraperitonealmente, resuspendido em solução de PBS 7,2. Em um grupo controle foi injetada somente solução de PBS 7,2. Os animais ficaram sob observação durante 24 h e foi calculada a porcentagem de mortalidade em cada grupo e os efeitos farmacológicos, avaliando as atividades no sistema motor, tônus muscular, reflexos e efeitos dos sistemas nervoso autônomo e central. Foi determinada a dose letal 50 (DL<sub>50</sub>), com limite de confiança de 95% da FAA e das substâncias isoladas através do método de Lithfield e Wilcoxon (Agarwal, 1982).

### ATIVIDADE ANTIOXIDANTE

#### Preparação dos extratos

As frações obtidas a partir das cascas desengorduradas, fração apolar e componentes isolados, conforme esquemas 7 e 8, foram utilizadas como soluções estoques (Mensor, Menezes *et al.*, 2001).

## Avaliação da atividade pela formação do complexo fosfomolibdênico<sup>3</sup>

As frações de alcalóides obtidas (FAA), fração apolar e substâncias isoladas (Esquemas 7 e 8) (200 µg/ml, 0,3 ml) foram tratadas com solução do complexo fosfomolibdênico previamente preparado (3 ml, 100 °C). Depois de atingido o tempo de reação (90 min), a absorvância foi determinada a 695 nm em um espectrofotômetro UV-VIS 1601 Shimadzu. A absorvância das amostras foi comparada com a absorvância do padrão de ácido ascórbico nas mesmas concentrações e condições de análise (Prieto, Pineda *et al.*, 1999).

Os resultados foram expressos na forma de atividade antioxidante relativa (AAR% (ac. ascórbico)), e os cálculos estabelecidos foram realizados através da seguinte equação:

$$\text{AAR\% (ácido ascórbico)} = \frac{\text{Abs (amostra)} - \text{Abs (branco)}}{\text{Abs (ác. ascórbico)} - \text{Abs (branco)}} \times 100$$

## Ensaio fotométrico com DPPH (1,1-difenil-2-picrilhidrazila)

As frações de alcalóides da agoniada, fração apolar e os componentes isolados AL1, AL2 e B1 foram diluídos em etanol de forma a serem obtidas soluções nas concentrações de 10, 25, 50, 125 e 250 µg/ml para a fração de alcalóides pH10; 25, 50, 125, 250 e 500 µg/ml para as frações de alcalóides pH11, 12 e 13 e 75, 250, 500, 750 µg/ml para as substâncias isoladas AL1, AL2 e B1. Na sequência, as soluções obtidas (2,5 ml) foram incorporadas à solução etanólica de DPPH (1,0 ml, 0,3 mM). O branco foi formado apenas pela mistura de etanol (1 ml) com as soluções obtidas (2,5 ml), de modo que, para cada concentração existiu um branco. Todas as

<sup>3</sup> Formado pela reação de solução de Na<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> (28ml, 0,1mol/l) com solução de (NH<sub>4</sub>)<sub>6</sub>Mo<sub>7</sub>O<sub>24</sub>.4H<sub>2</sub>O (12ml, 0,03mol/l) e solução de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (20ml, 3mol/l), sendo posteriormente o volume completado com H<sub>2</sub>O destilada para 100ml.

reações foram feitas em triplicata e nas mesmas condições de análise (30 min., 25 °C). Após o tempo de reação, as absorvâncias das amostras foram determinadas a 518 nm em um espectrofotômetro UV-VIS 1601 Shimadzu e convertidos em porcentagem de atividade antioxidante (IC%) utilizando a seguinte fórmula:

$$IC\% = 100 - \{[(Abs amostra - Abs branco) \times 100] / Abs controle\}.$$

Os resultados obtidos foram comparados com um padrão clássico de antioxidante, o ácido ascórbico. A expressão dos resultados foi dada pela IC<sub>50</sub> (em µg/ml) através de três metodologias diferenciadas, calculadas com auxílio da equação da reta interpolada com os dados de concentração (eixo das abcissas) e IC% (eixo das ordenadas), sendo comparadas a uma linha de tendência polinomial, tendência linear e através de análise de algoritmos.

Etanol e a solução amostra foram usados como branco. Solução de DPPH e etanol foram usados como controle negativo. Os controles positivos foram aqueles usando soluções padrão (Mensor, Menezes *et al.*, 2001).

### Interpolação polinomial de lagrange

Na análise da atividade antioxidante foi utilizado o método de interpolação de Lagrange (Guimarães e Nascimento, 2004).

O Polinômio de Lagrange é construído a partir do seguinte princípio: considere um conjunto de n pontos de coordenadas x e f(x), sendo que todos os x's são distintos. Podemos construir um polinômio de grau n-1 que passe por todos esses pontos. A fórmula de Lagrange para um polinômio de grau n seria:

$$P_q(x) = \sum_{i=0}^n \left( y_i \prod_{\substack{j=0 \\ j \neq i}}^n \frac{(x - x_j)}{(x_i - x_j)} \right)$$

## MIGRAÇÃO LEUCOCITÁRIA *IN VITRO*

Os sais e reagentes utilizados nos ensaios de quimiotaxia leucocitária foram de procedência Merck, salvo indicação contrária. Para o preparo das soluções, utilizou-se água ultrapura, obtida pelo sistema Puritech (Permutation, Curitiba-PR).

As soluções foram preparadas e em seguida esterilizadas por calor úmido (autoclavação a 121 °C, 30 min) ou filtração (0,22 µm – Acrodisc), sendo posteriormente armazenadas em temperaturas apropriadas para sua conservação (temperatura ambiente, 4-8 °C ou a -20 °C), ao abrigo da luz, conforme indicado.

### Obtenção de leucócitos humanos

Cinco a quinze mililitros de sangue periférico de voluntários sadios, colhidos com heparina sódica, foram usados como fonte de leucócitos humanos. As amostras foram coletadas após compreensão e consentimento do termo aprovado pelo Comitê de Ética do Hospital das Clínicas (HC) da Universidade Federal do Paraná, CEP/SD - Nº 039.SI003/04-01 (Anexos I e II). A contagem total de leucócitos foi realizada em câmara de Neubauer e a diferencial em extensões sanguíneas coradas por May-Grunwald-Giemsa (Dacie e Lewis, 1995).



## Isolamento de leucócitos humanos

O sangue periférico total foi centrifugado inicialmente por 15 min/200 g para retirada do plasma rico em plaquetas. Uma quantidade semelhante de PBS<sup>4</sup> em relação ao plasma retirado foi incorporado a amostra e centrifugada por 25 min/800 g. A porção intermediária, rica em leucócitos (*buffy-coat*), foi transferida para um tubo cônico contendo *q.s.p* 50 ml de solução lisante<sup>5</sup>. Após homogenização, a amostra foi submetida à rotação contínua por 8 min à T.A., centrifugada (5 min/800 g) e o sobrenadante desprezado. Os leucócitos foram submetidos à lavagem com PBS (2 vezes; 5 min/800 g), seguida de ressuspensão em PBSs<sup>6</sup> e em seguida, sua concentração ajustada para 10<sup>6</sup> células/ml (Dacie e Lewis, 1995).

## Viabilidade e citotoxicidade celulares

A viabilidade dos leucócitos foi observada após cada processo durante o isolamento, assim como para avaliação de eventuais efeitos tóxicos dos reagentes utilizados. Para tanto, foi usado o teste com azul de Trypan<sup>7</sup>, o qual baseia-se na habilidade que a membrana plasmática de células viáveis possuem de excluir o corante (Merchant e Kahn, 1964). Doses crescentes de uleína (3,75x10<sup>-8</sup> – 3,75x10<sup>-4</sup> mol/l) foram adicionadas a 10<sup>6</sup> células/ml. No momento da adição (t=0) e após 3, 6 e 24 h de incubação à 37 °C, a viabilidade das células foi observada em

---

<sup>4</sup> A solução salina tamponada (PBS) foi preparada dissolvendo-se NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>.2H<sub>2</sub>O (150 mmol/l), Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> (150 mmol/l) e NaCl (154 mmol/l) em água. Após ajuste do pH para 7,2 – 7,4 com solução de NaOH 1 M, procedeu-se a esterilização por autoclavagem e armazenamento a 4 – 8 °C.

<sup>5</sup> NH<sub>4</sub>Cl (80,2 g), NaHCO<sub>3</sub> (8,4 g) e EDTA dissódico (3,7 g) foram dissolvidos em *q.s.p* 1 litro de água. Essa solução foi armazenada a 4 °C (estoque). No momento do uso, 10 ml do concentrado (estoque) foram diluídos em 90 ml de água.

<sup>6</sup> PBS foi suplementado, em condições assépticas, na h do uso, com albumina de soro bovino (BSA) 0,25% (p/v), glucose 0,1% (p/v), CaCl<sub>2</sub> (0,9 mmol/l) e MgCl<sub>2</sub> (0,5 mmol/l).

<sup>7</sup> 0,4 g de azul de trypan em 100 ml de PBS.

hemocitômetro. Somente amostras contendo uma quantidade superior a 94% de células viáveis foram utilizadas nos experimentos.

## Substâncias isoladas como agentes quimioatratores de leucócitos

Foram realizados ensaios para verificar se a uleína nas doses de  $3,75 \times 10^{-15}$  –  $3,75 \times 10^{-4}$  mol/l possuíam potencial quimioatractor na suspensão padronizada de leucócitos ( $10^6$  células/ml). Os resultados obtidos pela contagem de células na câmara inferior de Boyden foram normalizados em 100% em relação ao controle negativo (PBSs) e comparados com um controle positivo de caseína 0,5% (p/v).

## Migração leucocitária *in vitro* (quimiotaxia)

A locomoção dos leucócitos em direção à caseína<sup>8</sup> (quimiotaxia positiva), foi observada em câmaras de Boyden (Colowick e Kaplan, 1999; Lee e Foerster, 1999). Para tanto, utilizou-se a técnica essencialmente descrita por Presibella, Santos *et al.* (2003), onde 200 µl de caseína 0,5% (p/v) foram adicionados ao compartimento inferior das câmaras.

Filtros de policarbonato isentos de polivinilpirrolidona (Nuclepore; Neuroprobe - Gaitherburg), com poros de 5 µm de diâmetro e 12 µm de espessura, foram usados para separar os compartimentos superior e inferior. O compartimento superior foi preenchido com 200 µl de suspensão de leucócitos em PBSs ( $10^6$  células/ml). As câmaras foram incubadas à 37 °C por 90

---

<sup>8</sup> Caseína em pó foi dissolvida em PBS (5 mg/ml) e aquecida à 56 °C por 10 min. A solução foi, então, resfriada rapidamente à 4 °C, centrifugada para remoção de partículas insolúveis (2500 rpm/5 min), aliquoteada e armazenada à -20 °C, sendo descongelada apenas na h do uso.

minutos e o número de leucócitos que migrou ativamente para o compartimento inferior foi estimado, com o auxílio de um hemocítômetro.

O monitoramento do movimento espontâneo dos leucócitos (controle) foi realizado de forma similar, porém usando-se PBSs ao invés de caseína 0,5%.

Em alguns experimentos, as suspensões de leucócitos foram previamente tratadas com diferentes concentrações de uleína ( $3,75 \times 10^{-14}$  –  $3,75 \times 10^{-6}$  mol/l) ou com fosfato dissódico de dexametasona – Decadron-Prodome ( $10^{-5}$  mol/l) por 30 min à 37 °C, com sulfato de morfina – Dimorf-Cristália ( $10^{-4}$  -  $10^{-8}$  mol/l) ou com cloridrato de naloxona – Narcan-rPr ( $10^{-5}$  -  $10^{-8}$  mol/l) por 10 min à 37 °C, isolados ou em associações. Em seguida foram lavadas duas vezes com PBS (800 g/5 min), ressuspensas em PBSs e submetidas ao ensaio de quimiotaxia.

## MIGRAÇÃO LEUCOCITÁRIA *IN VIVO* INDUZIDA POR CARRAGENINA

### Animais

Nos experimentos foram utilizados camundongos swiss albino (n=60; 25-30 g), provenientes do Centro de Produção e Pesquisa de Imunobiológicos (CPPI-PR). Os mesmos foram mantidos em ambiente com fotoperíodo controlado (ciclo claro escuro 12/12 h), temperatura constante ( $23 \pm 2$  °C), água e ração Nuvilab *ad libitum* e em seguida separados em grupos de dez animais. Os experimentos foram realizados de acordo com os “*Princípios de cuidados com animais de laboratório*” (NIH publicação 85-23, revisado em 1985) adotado pela Universidade Federal do Paraná (UFPR).

## Avaliação da potência antiinflamatória

Os grupos de animais foram tratados por via intraperitoneal (*i.p*) com PBS, uleína (0,5 g/kg) ou dexametasona (0,5 mg/kg). Decorridos 60 min dos tratamentos, foram injetados nos animais 0,25 ml de suspensão de carragenina 1% (Carrageenan Iota Sigma). Após quatro horas os animais foram ortotansados com inalação de éter e injetados 2 ml de PBS heparinizado (10 UI/ml), sendo o fluido peritoneal coletado e a amostra diluída em solução de Türk 3% (1:20). A contagem do número de leucócitos migrados foi realizada em câmara de Neubauer. Os resultados foram expressos como médias $\pm$ EPM do número de leucócitos totais de cada grupo ( $\times 10^7$  células/ml).

## BIOENSAIO ANTIMICROBIANO

As culturas bacterianas foram obtidas de cepas padrões (ATCC) e de amostras clínicas recentemente isoladas e identificadas de humanos no laboratório do Hospital Universitário Cajuru, Pontifícia Universidade Católica do Paraná (PUC-PR). Os testes de susceptibilidade foram realizados usando um método padrão denominado Kirby-Bauer (NCCLS, 2002). Os microrganismos foram viabilizados 24 h antes da realização dos testes. As suspensões bacterianas foram feitas em solução de salina estéril<sup>9</sup> (0,85%) usando escala de McFarland # 0,5. As concentrações finais de bactérias obtidas foram em torno de  $1,0 - 6,0 \times 10^5$  UFC/ml.

As suspensões foram inoculadas em meio de Mueller Hinton (MH) usando swab de algodão estéril. Os testes foram preparados a partir da fração apolar, frações de alcalóides da agoniada e substâncias isoladas (Esquema 7 e 8) dissolvidos em dimetilsulfóxido (DMSO) ou

---

<sup>9</sup> NaCl (0,9 g) em água destilada (100 ml) e autoclavada.

etanol (EtOH) de forma a serem obtidas concentrações crescentes iguais a 31,25, 62,5, 125, 250, 500 e 1000 µg/ml e distribuídos em vários discos de papéis esterilizados com diâmetro de 6 mm. Os discos foram secos em temperatura ambiente e colocados no ágar Mueller Hinton previamente inoculados com suspensões bacterianas. As placas foram incubadas 37 °C/24 h. Em seguida, as placas foram observadas verificando a área de inibição ao redor do disco (mm), incluindo o diâmetro do próprio disco. Todos os testes foram realizados em triplicata. Os resultados foram comparados com discos de antibióticos padrões (cloranfenicol – 30 µg/ml, vancomicina – 30 µg/ml e ampicilina sulbactam – 30 µg/ml) bem como discos contendo os solventes DMSO e etanol como controles negativos.

A capacidade de embebição de líquidos em cada disco, foi realizada segundo a técnica especificada por Moura (1987), sendo obtida a capacidade máxima de 26,9 µl, porém o volume utilizado foi de 10 µl/disco.

## DOSAGEM DE ÓXIDO NÍTRICO

### Linhagens celulares

Células endoteliais de aorta de coelho (rabbit aorta endothelial cells - RAEC) gentilmente doadas pela Dra. Helena Nader (UNIFESP) e células melanoma de camundongos (mouse melanoma cells - B16F10) American Type Culture Collection (cat # ATCC CRL-6475), foram cultivadas em meio apropriado e mantidas em Banco de células do NIMA (Núcleo de Investigações Moleculares Avançadas), Centro de Ciências Biológicas e da Saúde da Pontifícia Universidade Católica do Paraná (PUC-PR).

## Cultura celular

As células foram mantidas em meio de cultura DMEM/F12 (RAEC) e RPMI 1640 (B16F10), suplementado com 10% de soro fetal bovino, 100 U/ml de penicilina e 10 µg/ml gentamicina. As células foram plaqueadas em placas de 96 poços na densidade de  $1 \times 10^5$  células/ml, volume final de 400 µl e incubadas a 37 °C com 5% de CO<sub>2</sub> e atmosfera umidificada, sendo o meio trocado a cada 48 h até confluência das células.

## Viabilidade e citotoxicidade celulares

Para o teste de viabilidade celular e citotoxicidade foi usado o teste com azul de Trypan 0,4%, anteriormente mencionado no ensaio de quimiotaxia (Merchant e Kahn, 1964).

## Substâncias isoladas

A partir da substância isolada AL1 (uleína) foram feitas soluções estoques de 2 mg/ml em meio nutriente DMEM/F12 (Dulbecco's Modified Eagle's Medium) e RPMI (RPMI 1640 Medium) em condições estéreis e armazenadas à -8 °C até o momento do uso. Em cada ensaio, a uleína foi diluída nos respectivos meios de cultura.

## Dosagem

Após os cultivos celulares atingirem confluência desejada, a uleína foi adicionada nas concentrações de 0,01, 0,1, 1, 10 e 100 µg/ml, isoladamente ou em associação com nitro-L-

arginina metil éster (L-NAME - 1 µg/ml), um inibidor da NOS. Um estimulador da NOS também foi utilizado (LPS - 100 ng/ml). Vinte e quatro horas após a ativação, um volume de 100 µl do sobrenadante foi retirado e a ele adicionado igual volume do reagente de Griess<sup>10</sup> (Green, Wagner *et al.*, 1982). A produção de NO foi estimada pela quantificação do metabólito estável de NO, o nitrito. A absorvância a 540 nm foi medida em leitor de Elisa Spectra Softmax após 10 min. A concentração de nitrito no sobrenadante foi quantificada a partir de uma curva padrão com concentrações conhecidas de nitrito de sódio em µM.

## TESTE DE ADESÃO CELULAR

### Linhagens celulares

Células B16F10 (mouse melanoma cells - cat # ATCC CRL-6475) e células RAEC (rabbit aorta endothelial cells) foram cultivadas em meio apropriado e mantidas em Banco de células do NIMA (Núcleo de Investigações Moleculares Avançadas), Centro de Ciências Biológicas e da Saúde da Pontifícia Universidade Católica do Paraná (PUC-PR).

### Cultivo celular

Células de melanoma de camundongos (B16F10) e células endoteliais de aorta de coelho (RAEC) mantidas em tanques de nitrogênio sob temperatura de -180 °C foram descongeladas e cultivadas em meio RPMI 1640 (Cultilab) e meio nutriente DMEM/F12, respectivamente,

---

<sup>10</sup> Sulfanilamida 1% p/v, em H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> 5%, juntamente com alfa-naftil-etilenodiamina 0,1%v/v em água.

contendo soro fetal bovino (SFB 10%), estreptomicina (10 µg/ml) e penicilina (100 U/ml), mantida em atmosfera de 37 °C e 5% de tensão de CO<sub>2</sub>. Após atingirem confluência e contagem suficiente (10<sup>6</sup> células/ml), células B16F10 e RAEC foram tratadas com concentrações crescentes de uleína (10<sup>-5</sup> - 100 e 10<sup>-2</sup> - 100 µg/ml, respectivamente) e colocadas em placas de 24 poços, sendo novamente incubadas nas mesmas condições anteriores para adesão por 90 min (Wang, Cao *et al.*, 2003). Para os controles foram utilizados células de melanoma de camundongos (B16F10) em meio RPMI 1640 e células endoteliais de aorta de coelho (RAEC) em meio nutriente DMEM/F12, sem a presença de uleína.

Em outros experimentos, o efeito da presença de matriz sobre a adesão celular foi avaliado. Para isso, foi realizado um revestimento em placas de 96 poços utilizando proteínas de matriz (fibronectina 15 µg/ml, laminina 15 µg/ml e vitronectina 15 µg/ml) doadas pela Prof. Dra. Lia Sumie Nakao, Pontifícia Universidade Católica do Paraná, secas à temperatura ambiente. Meio RPMI 1640 (20 µl) contendo 2% SFB foi utilizado para cobrir a placa a 37 °C por 60 min, sendo lavada com PBS (3X). Células B16F10 (10<sup>6</sup> células/ml) foram pré-tratadas com concentrações crescentes de uleína (10<sup>-5</sup> – 10 µg/ml) por 2 h e adicionadas na placa de 96 poços e incubadas por 90 min.

### Avaliação da adesão celular *in vitro*

A avaliação da adesão celular nas linhagens B16F10 e RAEC foram realizadas por método colorimétrico. As placas contendo células tratadas com uleína em diferentes concentrações foram lavadas três vezes com solução de tampão salino fosfato pH 7,4 (PBS) para retirada das células não aderidas, fixadas com metanol (10 min/T.A), lavadas com PBS (três vezes) e coradas com solução de cristal violeta a 0,2% em etanol 2% (2-5 min). Posteriormente as



células residuais foram lavadas novamente com PBS (dez vezes) e lisadas com solução de citrato de sódio  $10^{-1}$  mol/l e etanol (1:1) por 10 min e a absorvância do lisado foi medida por espectrofotômetro em 540 nm. As absorvâncias das amostras foram comparadas com a do controle na mesma condição de análise e os resultados expressos na forma de porcentagem de adesão. Para as fotomicrografias foi utilizado um microscópio invertido Olympus BH-2.

## Análises estatísticas

Os resultados foram apresentados como média $\pm$ EPM, analisados usando pacote estatístico Sigmastat® para Windows (Versão 3.5, USA) e, para a comparação entre os grupos, foi utilizado ANOVA seguido de teste de Tukey, Holm-Sidak, Mann-Whitney ou Kruskal-Wallis, com valores de  $P \leq 0,001$ ,  $P \leq 0,01$  e  $P \leq 0,05$ , conforme aplicado, considerados estatisticamente significativos.

## RESULTADOS E DISCUSSÕES

### ABORDAGEM FITOQUÍMICA

O material vegetal foi identificado positivamente como sendo as cascas do caule de *Himatanthus lancifolius* (Muell. Arg.) Woodson – Apocynaceae e o resultado da abordagem fitoquímica realizada está de acordo com os resultados divulgados por estudos quimiotaxonômicos anteriormente realizados, onde fica evidenciada a presença principalmente de alcalóides e outros metabólitos na espécie da família Apocynaceae (Kisakurek e Hesse, 1980; Kazmi, 1989; Massiot, Boumendel *et al.*, 1992; Franca, Brown *et al.*, 2000).

A pesquisa dos principais grupos de metabólitos das cascas de *Himatanthus lancifolius*, Apocynaceae, tem seus resultados sumarizados na Tabela 3.

**Tabela 3.** Abordagem fitoquímica das cascas de *H. lancifolius* (Muell. Arg.) Woodson, Apocynaceae.

Metabólitos	Métodos	Resultado
Flavonóides	Reações de Shinoda; Cloreto de alumínio	Negativo
Alcalóides	Reações gerais de alcalóides (RGA)	<b>Positivo</b>
Glicosídeos cardiotônicos	Reação de Pesez; Reação de Kedde	<b>Levemente Positivo</b>
Saponinas	Formação de espuma	Negativo
Antraquinonas livres e glicosídicas	Reação de Borntrager direta; Hidrólise ácida	Negativo
Taninos	Reações clássicas: Gelatina; Acetato de chumbo; Cloreto férrico	<b>Positivo</b>
Açúcares	Teste de Molish	<b>Positivo</b>

Das classes de constituintes químicos encontradas nas cascas de *H. lancifolius*, a grande maioria delas referem-se a alcalóides derivados do triptofano, que sabidamente estão presente em plantas da família Apocynaceae e já haviam sido citados por Cuellar e O’Farril (1976) e Robbers, Speedle *et al.* (1996). Dados da literatura mostram que a tribo Alstoniae, a qual *H. lancifolius*

pertence, é uma das mais estudadas e apresenta uma diversidade muito grande de estruturas elucidadas, basicamente esqueletos do tipo aspidospermina (Joule e Djerassi, 1964; Kisakurek e Hesse, 1980). Em prévios estudos fitoquímicos, a literatura é farta em demonstrar os vários iridóides presentes nas espécies do gênero *Himatanthus* (Kardono e Tsauri *et al.*, 1990; Barreto, 1998). Notoriamente alguns alcalóides isolados da espécie *H. lancifolius* são nesse trabalho citados pela primeira vez. Lima, Braga *et al.* (1999) citam que das 14 espécies que representam o gênero *Himatanthus* apenas cinco já foram estudadas do ponto de vista químico e que nada foi citado com relação à presença de alcalóides.

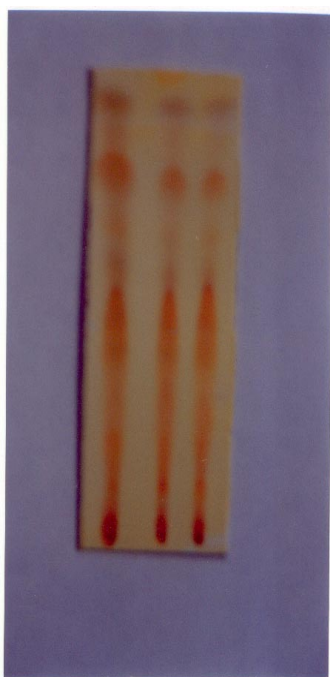
A presença de alcalóides ficou evidenciada pela avaliação do extrato aquoso acidificado (HCl 1%) em cromatografia de camada delgada e revelados com reagente de Dragendorff (Figura 7), onde apresentaram pelo menos oito manchas características desses alcalóides, sendo que quatro alcalóides de núcleo indólico já foram isolados, contudo apenas dois desses puderam ser identificados (Franca, Brown *et al.*, 2000).

Foi realizada uma CCD das frações de alcalóides da agoniada (FAA), reveladas com reativo de Dragendorff (Figura 8) e sulfato cérico amoniacal, a qual demonstrou que todas essas frações alcalinizadas com diferentes pH possuem perfil cromatográfico semelhante, e particularmente a fração pH10 possui uma mancha cromatográfica mais intensa, representando uma maior quantidade de alcalóides. Conforme aumenta o pH, observa-se um decréscimo da intensidade dessas manchas pela diminuição da quantidade alcaloídica extraída. As quantidades inferiores de manchas nas frações em relação ao extrato aquoso acidificado a 1% pode ser justificado pela ausência de alcalóides quartenários, pois esses geralmente não são removidos pela metodologia de extração utilizada nesse trabalho (Esquema 7). Componentes neutros e ácidos da mistura original são removidos durante extração do solvente utilizado conforme descrito por Cordell (1981). Os alcalóides foram obtidos por extração com clorofórmio ou acetato

de etila, sendo que os mesmos alcalóides foram obtidos em ambos solventes utilizados, com um rendimento superior com o uso do clorofórmio como agente extrator.

Os extratos alcalinizados com carbonato de sódio, hidróxido de sódio e amônia não apresentaram presença de artefatos, pois em alguns casos, a amônia na presença de alcalóides indólicos podem dar origem a novos alcalóides não presentes na planta original.

No teste qualitativo, a planta apresentou também uma predominância de glicosídios, por desenvolverem coloração alaranjada ao teste de Molish e confirmada através de CCD (Figura 9) revelada com orcinol, utilizando como padrão a sacarose e a lactose.



**Figura 7.** CCD do extrato aquoso acidificado (HCl 1%) revelado com reativo de Dragendorff usando como fase móvel *n*-hexano: acetato de etila: MeOH: dietilamina (5:4:0,8:0,2).



**Figura 8.** CCD das frações alcalinizadas pH 10, 11, 12, 13, 14 revelado com reativo de Dragendorff usando como fase móvel *n*-hexano: acetato de etila: MeOH: dietilamina (5:4:0,8:0,2).

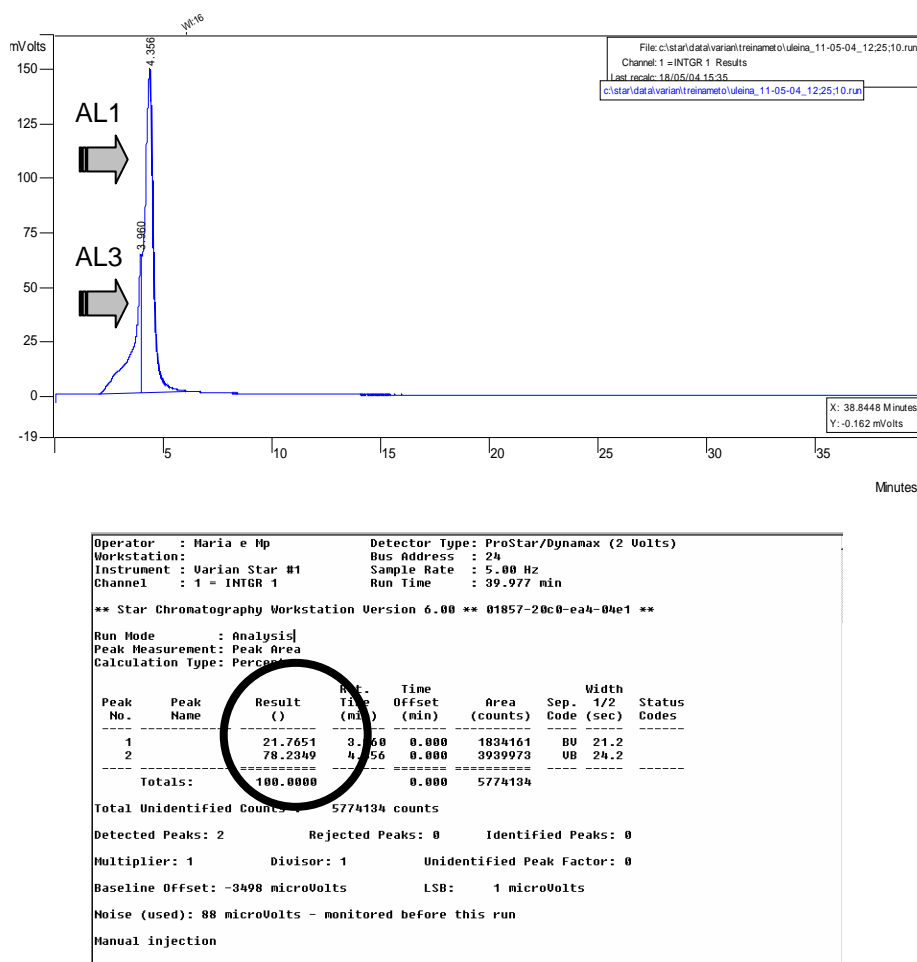


**Figura 9.** CCD do composto B1 revelado com orcinol usando como fase móvel propanol: água (7:3 v/v) juntamente com padrão de sacarose e lactose.

## ALCALÓIDES ISOLADOS

### Substância AL1

A primeira substância AL1 foi isolada por cromatografia de camada delgada preparativa na forma de cristais brancos (0,102 g,  $\eta=0,0035\%$ ,  $R_f$  0,37) e por cromatografia em coluna como uma substância amorfa de coloração acastanhada (0,2051g,  $\eta=0,0070\%$ ,  $R_f$  0,37). A corrida utilizando CLAE mostrou pureza da forma amorfa acastanhada de 78,2349% (Figura 10) e 100% de pureza nos cristais brancos, usando uma fase móvel de acetonitrila:metanol (1:1) grau HPLC, coluna C 8, com fluxo de 0,8 ml/min e absorvância de 305 nm, obtendo um tempo de retenção de 4,356 min. Esse composto na forma amorfa, monitorado por CLAE, foi submetido posteriormente a uma placa preparativa onde isolou-se as substâncias AL1 e AL3. Nas mesmas condições cromatográficas utilizadas, a substância AL3 apresentou tempo de retenção de 3,960 min (pureza de 21,7651%), muito próximo ao apresentado para a substância AL1. No decorrer da análise, o espectro de RMN  $^1\text{H}$  foi fundamental para a diferenciação dessas substâncias, uma vez que esses alcalóides apresentam tempo de retenção muito próximo (Jacome e Oliveira, 2004).

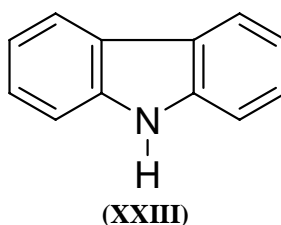


**Figura 10.** Cromatograma da mistura de alcalóides AL1 e AL3 apresentando tempo de retenção próximos, com suas respectivas porcentagens de pureza (círculo), usando uma fase móvel de acetonitrila:metanol (1:1) grau HPLC, coluna C-8, fluxo de 0,8 ml/min e absorvância de 305 nm.

O espectro de UV apresentou uma banda característica em  $\lambda_{\max}$  (MeOH) 303,8 nm característica do núcleo  $\alpha$ -vinil indol, muito semelhante ao máximo de absorção em 309 nm citado por Jacome e Oliveira (2004). O espectro no infravermelho evidenciou sinais em 3394 (deformação axial N-H), 2921 e 2820 (deformação axial simétrica de  $\text{CH}_2$ ), 1633 (anel aromático) e sinais menores em 1555, 1459 (deformação angular simétrica no plano) corroborando com o demonstrado por Sangster e Stuart (1965); Borris, Lankin *et al.* (1983); Williams e Fleming (1987); Franca, Brown *et al.* (2000). A substância exibiu também bandas importantes em 1733, 1310, 997, 877 e 725  $\text{cm}^{-1}$ .

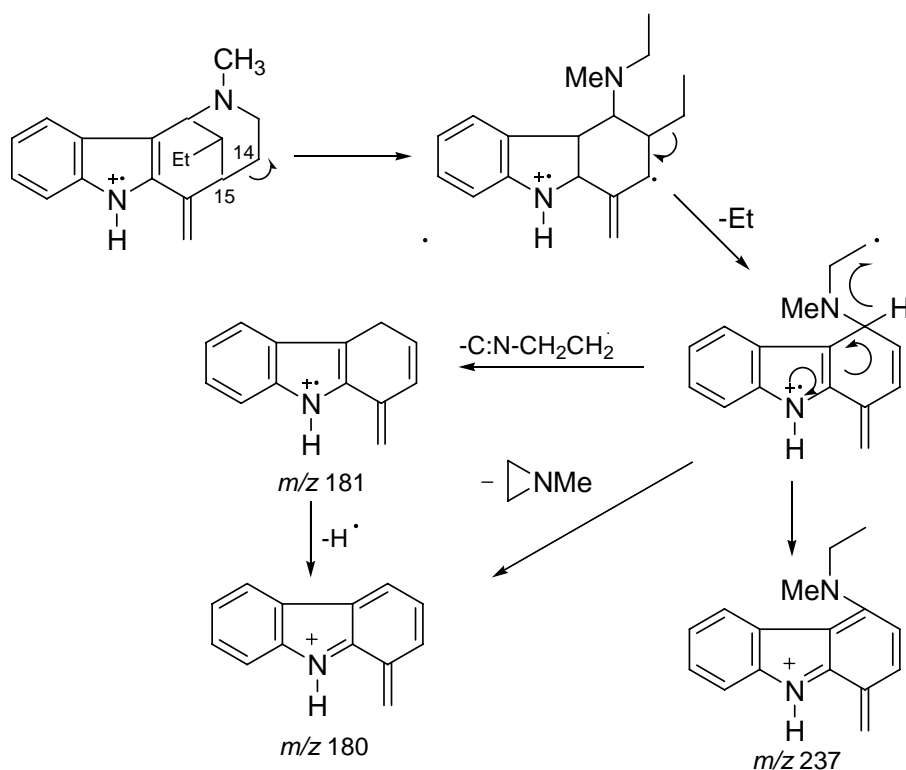
A substância cristalizada apresentou ponto de fusão entre  $74 \pm 4,5$  °C usando o Alzobenzol (68 °C), benzil (95 °C), Acetanilida (114,5 °C) e Fenacetina (134,5 °C) como sais padrões para calibração do aparelho Buchi SMP-20, corroborando com o descrito por Franca, Brown *et al.* (2000). Porém, o ponto de fusão mostrou-se diferente dos valores apresentados por Borris, Lankin *et al.* (1983) com ponto de fusão variando de 74-98 °C, Jacome e Oliveira (2004) de 78-85 °C e Buchi e Warnhoff (1959) com valor igual a 152 °C. Essas variações podem ser justificadas pelo fato de que na maioria das vezes as substâncias isoladas não encontram-se totalmente puras, apresentando uma forma amorfa não cristalizada, diferente da substância inicialmente isolada utilizada para esse ensaio.

O espectro de massas de AL1 (Figura 11) apresentou íon molecular em  $m/z$  267 ( $M^+ + 1$ ), 266 ( $M^+$ ), correspondendo a uma substância de fórmula molecular  $C_{18}H_{22}N_2$ . É notado que essa substância possui um esqueleto com dezessete carbonos, os quais contém dois carbonos a menos do que a maioria dos outros alcalóides indólicos (Buchi e Warnhoff, 1959). Fragmentos em  $m/z$  251 ( $M^+ - 15$ ) e  $m/z$  237 ( $M^+ - 29$ ) indicam a presença de um grupo metila terminal (C-18/19) e também a perda de ( $C_2H_5$ ), respectivamente, como também o aparecimento de sinais de derivados do carbazol ( $m/z$  167) (**XXIII**) que confirmam a possibilidade da substância AL1 ser um alcalóide do grupo indólico.



O fragmento  $M^+ - C_2H_5$  pode ser explicado pela localização de íon na ligação C-14/15, que é ativada pela posição alila, e ocorrendo a quebra da ligação e perda de radical etila com

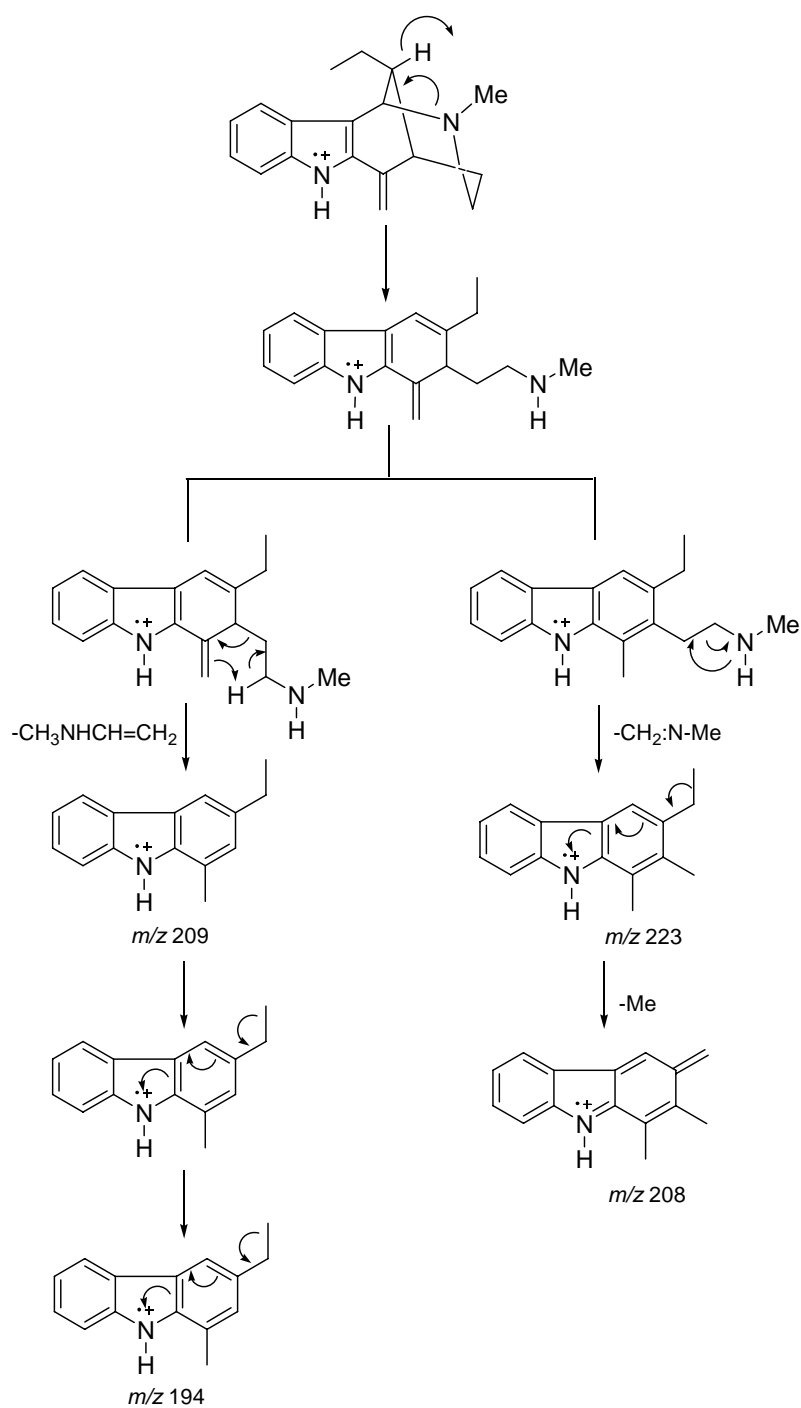
formação subsequente de fragmentos com  $m/z$  237. Alternativamente, a perda do substituinte de C-21 com transferência de um hidrogênio N-metil pode ocorrer a formação de  $m/z$  181 e subsequente perda de hidrogênio benzílico de  $m/z$  181 ou a perda da cadeia lateral amina formando a espécie totalmente conjugada  $m/z$  180 (Esquema 9) corroborando com o descrito por Manske e Rodrigo (1965).



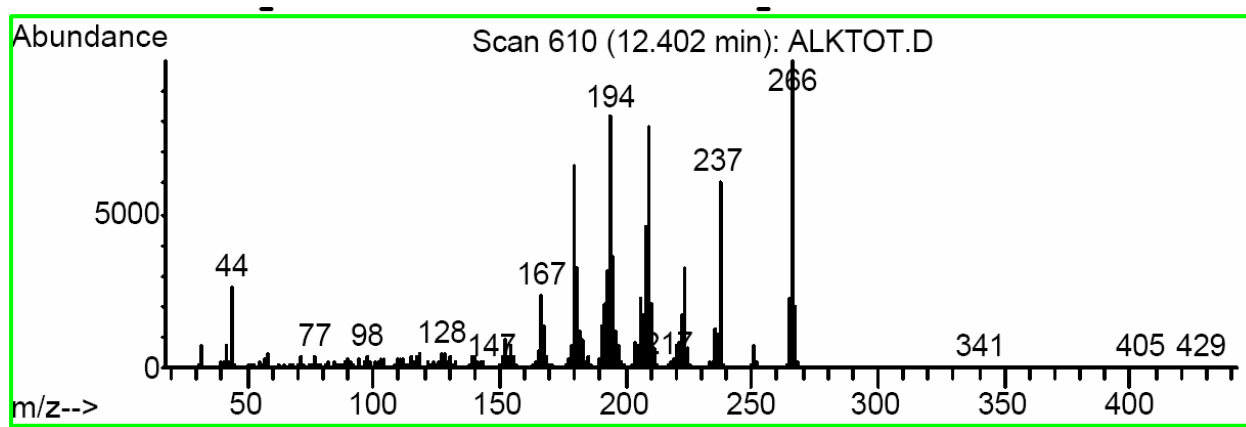
**Esquema 9.** Fragmentação do espectro de massas de AL1.

O importante íon  $m/z$  209 pode ser formado por rearranjo de hidrogênio através de um intermediário de seis membros, adicional quebra da ligação benzílica com perda de um radical metila origina o íon  $m/z$  194 (Esquema 10). Outros fragmentos estão presentes em  $m/z$  180, 151, 127, 112, 98, 77, 58 e 32.





**Esquema 10.** Fragmentação do espectro de massas de AL1.

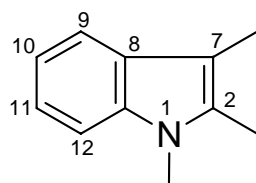


**Figura 11.** Espectro de massas de AL1.

As melhores informações foram provenientes dos experimentos obtidos por ressonância magnética nuclear de prótons. O espectro de RMN  $^1\text{H}$  (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ), que apresentou em  $\delta$  0,88 um triplete ( $J=7,4$  Hz, H-18) com integração para três prótons, corresponde a um grupo metila ligada a um metileno com sinal em  $\delta$  1,15 ( $J=7,4$  Hz, H-19), confirmando a presença do grupo etila na estrutura.

Um singlete com integração para três prótons aparece em  $\delta$  2,59 (N-Me), cujo deslocamento sugere a presença de um grupo N- $\text{CH}_3$ , corroborando com o descrito por Jacome e Oliveira (2004) que citam a presença desse simpleto em  $\delta$  2,30. A presença de dois singletos em  $\delta$  5,21 (H-17a) e  $\delta$  5,59 (H-17b), com integral para um próton cada, característico de prótons em carbono  $\text{sp}^2$ , corresponde a presença de um grupo  $\text{H}_2\text{C}=\text{C}$  exocíclico. Uma série de sinais na região alifática do espectro pode ser assinalada para prótons metínicos e metilênicos. Um duplete ( $J=1,5$  Hz) para um próton em  $\delta$  4,55 (H-21) pode ser assinalado para o próton do carbono que faz ponte entre o núcleo indol e  $\text{N}_b$  (C-21), esse por acoplamento a longa distância ( $J=1,5\text{Hz}$ ) com o hidrogênio ligado a C-15 (Williams e Fleming, 1987; Breimaier, 1993). No entanto, é característico na região aromática do espectro o padrão para substâncias derivadas indólicos não-

substituídos (**XXIV**) um sinal correspondente a NH entre  $\delta$  8 e 9, um duplo duplete para os prótons H-9 e H-12 em torno de  $\delta$  7,3 e 7,5 e, abaixo do sinal do clorofórmio residual, dois tripletos superpostos para os prótons H-10 ( $\delta$  7,18,  $J=7,37$  Hz) e H-11 ( $\delta$  7,26,  $J=7,37$ Hz) (Verpoorte e Schiripsema, 1991).



(**XXIV**)

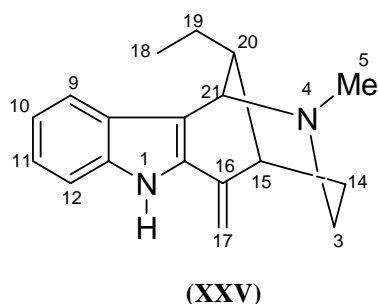
Pode-se observar que na região aromática do espectro de AL1 aparecem dois tripletos com integração para um próton cada  $\delta$  7,1 e 7,2 ( $J=7,37$  e 7,38 Hz, respectivamente). Um duplo duplete em  $\delta$  7,5 para dois prótons e um singlete largo em  $\delta$  9,0 (N-H), correspondendo ao padrão de espectro de **XXIV** (Verpoorte e Schiripsema, 1991).

Outros deslocamentos importantes dos espectros de RMN  $^1\text{H}$  estão presentes em  $\delta$  1,27 (H-14a),  $\delta$  1,8 ( $J=9,4$  Hz, H-3a),  $\delta$  2,52 ( $J=8,47$  Hz, H-14b),  $\delta$  2,67 (H-3b),  $\delta$  2,82 ( $J=1,51$ , H-15),  $\delta$  2,99 ( $J=6,9$  Hz, H-20).

Para comprovação da estrutura, o espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  de AL1 juntamente com os dados citados na literatura foram bastante significativos (Borris, Lankin *et al.*, 1983). A ressonância e indicação para a uleína foi determinado para  $\text{CDCl}_3$  em 30,21 ppm. O sinal em 11,16 ppm foi assinalado para o grupo metila C-18, cuja ressonância em campo alto é presumível por ser o carbono mais blindado da estrutura. O sinal em 24,56 pode ser atribuído ao C-19, pois a cadeia lateral etila está equatorial ao anel piperidínico, corroborando com o descrito por Jacome e Oliveira (2004) atribuindo um  $\delta$  24,35 ao C-19. Assim a interação 1,3 axial é esperada ocorrer entre o grupo etila e o próton em C-14. Isso resultaria em uma compressão estérica de C-14 e C-20. Dessa forma, o sinal em  $\delta$  32,89 pode ser ao C-14. Deslocamentos em campo alto da

ressonância de C-15 e C-21 são provavelmente devido a um aumento na tensão no anel piperidinico resultante dessa interação. O deslocamento químico da metila terminal em AL1 em  $\delta$  0,88 aparece de forma blindada por encontrar-se acima do núcleo aromático. Outros deslocamentos importantes dos espectros de RMN  $^{13}\text{C}$  estão presentes em 38,3 (C-15), 42,0 (C-20), 44,6 (N-CH<sub>3</sub>), 48,0 (C-3), 59,2 (C-21), 111,3 (C-12), 112,1 (C-7), 118,9 (C-9), 121,6 (C-11), 123,8 (C-8) corroborando com o descrito por Borris, Lankin *et al.* (1983) e Jacome e Oliveira (2004).

Investigação química da substância AL1, usando métodos espectrométricos descritos acima e por comparação com a literatura, sugeriu que a substância da espécie *Himatanthus lancifolius*, é um raro exemplo de alcalóide indólico que contém a unidade monoterpênica com ausência de uma ponte de dois carbonos da triptamina denominado uleína (**XXV**) (Pelah, Kielczewski *et al.*, 1963; Joule e Djerassi, 1964; Ohashi, Joule *et al.*, 1964; Budzikiewicz, Djerassi *et al.*, 1964; Gaskell e Joule, 1967; Borris, Lankin *et al.*, 1983; Williams e Fleming, 1987; Verpoorte e Schiripsema, 1991; Breimaier, 1993; Franca, Brown *et al.*, 2000). Essa substância foi primeiramente identificada por Schmuz, Hunzicher *et al.* (1957), isolada do extrato metanólico de *Aspidosperma ulei* Mgf.



(+) **uleína**. PF: 74 °C $\pm$ 4.5 (MeOH); UV max (MeOH): 305; IR bands (KBr): 3394, 2921, 1733, 1555, 1459, 725  $\text{cm}^{-1}$ ; MS  $m/z$  (%): 267 ( $\text{M}^+ + 1$ ) 266 ( $\text{M}^+$ ), 237 (12), 233 (9), 209 (18), 194 (18), 180 (22), 91 (100), 44 (50) [calcd. For  $\text{C}_{18}\text{H}_{22}\text{N}_2$ : 266,1783; found: 266,1781]; RMN  $^1\text{H}$  ( $\text{CDCl}_3$ , 400 MHz):  $\delta$  0.88 (3H, *t*, *J* 7.4, H-18), 1.15 (2H, *quintet*, *J* 7.4, H-19), 1.27 (1H, *bs*, H-14a), 1.80 (1H, *bd*, *J* 9.4, H-3a), 2.52 (1H, *d*, *J* 8.47, H-14b), 2.59 (3H, *s*, N-Me), 2.67 (1H, *bd*, H-3b), 2.82

(1H, *d*, *J*, 1.51, H-15), 2.99 (1H, *bd*, *J* 6,9, H-20), 4.55 (1H, *d*, *J* 1.51, H-21), 5.21 (1H, *s*, H-17a), 5.59 (1H, *s*, H-17b), 7.18 (1H, *t*, *J* 7.37, H-10), 7.26 (1H, *t*, *J* 7,37, H-11), 7.46 (1H, *dd*, *J* 8, 1, H-12), 7.49 (1H, *dd*, *J* 8, 1, H-9), 9.0 (1H, *bs*., N-H); RMN  $^{13}\text{C}$  ( $\text{CDCl}_3$ , 400 MHz): 11.16 (C-18), 24.56 (C-19), 32.89 (C-14), 38.38 (C-15), 42.08 (C-20), 44.66 (N-CH<sub>3</sub>), 48.09 (C-3), 59.22 (C-21), 104.0 (C-17), 111.31 (C-12), 112.14 (C-7), 118.90 (C-9), 121.0 (C-10), 121.68 (C-11), 123.83 (C-8).

## Substância AL2

A substância AL2 foi identificada por métodos espectrométricos e por comparação com a literatura como sendo o alcalóide ioimbina (**IV**), já descrito por Aynilian e Farnsworth (1974), Le Verge *et al.* (1992) e atualmente isolado e amplamente discutido no programa de pós-graduação em ciências farmacêuticas da UFPR na espécie *Himatanthus lancifolius* (Lopes, 2007).

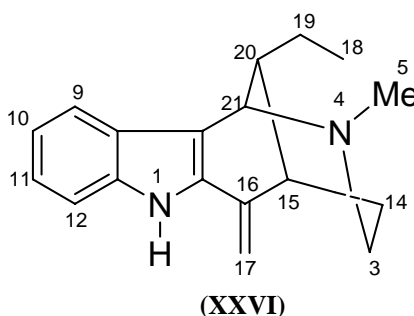
## Substância AL3

A substância AL3 apresentou-se na forma de cristais brancos (0,089 g,  $\eta=0,0030\%$ ,  $R_f$  0,34) e seu espectro de UV apresentou bandas em  $\lambda_{\text{max}}$  (MeOH) 207, 307 nm. A substância cristalizada apresentou ponto de fusão de  $118\pm0,49$  °C e tempo de retenção de 3,960 min, usando uma fase móvel de acetonitrila:metanol (1:1) grau HPLC, coluna C 8, com fluxo de 0,8 ml/min e absorvância de 305 nm.

Nas substâncias AL1 e AL3, os sinais de ressonâncias para C-7, C-8, C-9, C-10, C-11 e C-12 foram feitos por analogia com valores similares aos átomos de carbono da Catarantina (Borris, Lankin *et al.*, 1983).

De acordo com a literatura, os espectros de RMN  $^1\text{H}$  para a uleína e *epi*-uleína são semelhantes, mas diferem justamente em relação aos tripletos correspondentes aos grupos  $\text{CH}_3$  (C-18) do grupo etila, centrados em  $\delta$  0,88 para uleína e em  $\delta$  1,03 para *epi*-uleína. O grupo etila na uleína está sobre o sistema  $\pi$ -aromático e, portanto, espera-se para 3H-18 um sinal mais próximo do TMS ( $\delta$  0,88), devido a proteção do sistema  $\pi$ , enquanto que na *epi*-uleína o grupo etila está a direita e o mesmo sinal aparece em  $\delta$  1,03 (Buchi e Warnhoff, 1959), presumidamente devido à combinação do efeito estérico do anel. Na *epi*-uleína a posição do grupamento etila é axial com relação ao anel piperidínico, entretanto na uleína, ele é equatorial.

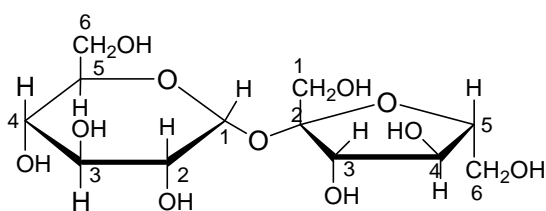
Investigação química da substância AL3, usando métodos espectrométricos descritos acima e por comparação com a literatura, sugeriu que a substância isolada é a *epi*-uleína (**XXVI**) (Jacome e Oliveira, 2004).



***epi*-uleína (XXVI).** PF:  $118\text{ }^\circ\text{C} \pm 0.49$  (MeOH); UV max (MeOH): 207, 307; MS  $m/z$  (%): 267 ( $\text{M}^+ + 1$ ) 266 ( $\text{M}^+$ ), 237 (12), 233 (9), 209 (18), 194 (18), 180 (22), 91 (100), 44 (50); RMN  $^1\text{H}$  ( $\text{CDCl}_3$ , 400 MHz):  $\delta$  1.03 (3H, *t*,  $J$  7.4, H-18), 1.22 (2H, *t*,  $J$  7.4, H-19), 2.0 (2H, *m*, H-14), 2.30 (1H, *m*, H-3a), 2.70 (1H, *m*, H-3b), 4.15 (H, *d*, H-21), 4.85 (H, *s*, H-17), 5.30 (1H, *s*, H-17), 7.5 (1H, *d*, H-12), 8.70 (1H, *s*, H-1).

## Substância B1

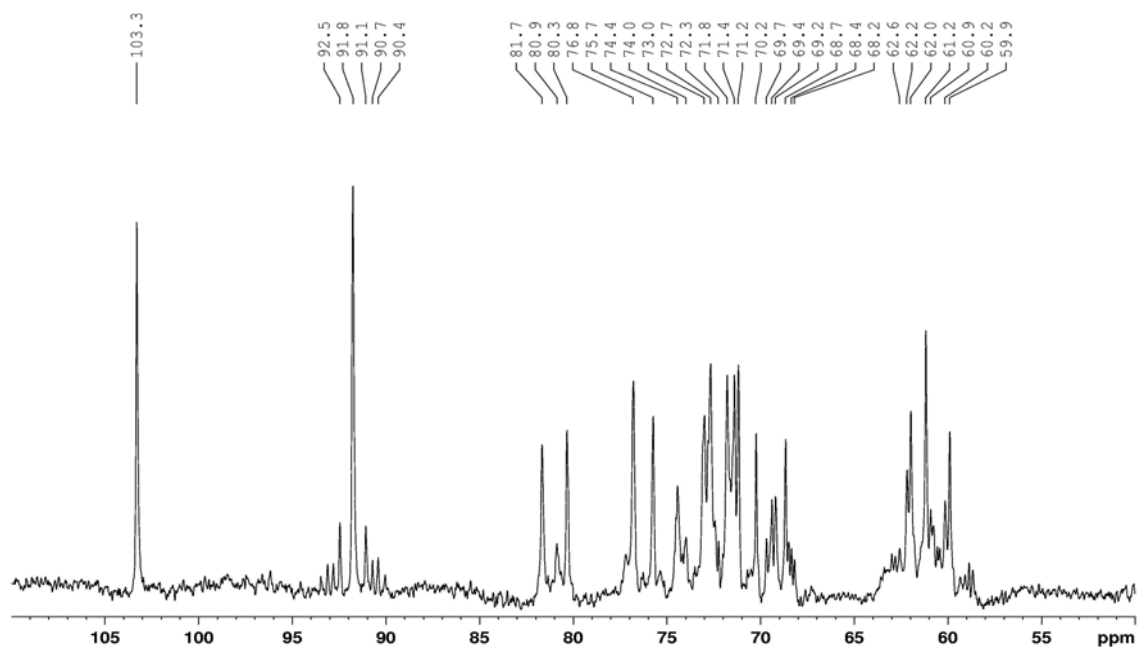
Análise dos espectros de CG-EM e RMN  $^{13}\text{C}$  da substância isolada B1, aliados aos seus dados físicos, permitiu sugerir a estrutura do dissacarídeo sacarose **(XXVII)**, sendo seu isolamento já relatado em extratos vegetais como descritos por De-Bruyn e Loo (1991), Vanderlei, Silva *et al.* (1991) e Barreto (1998).



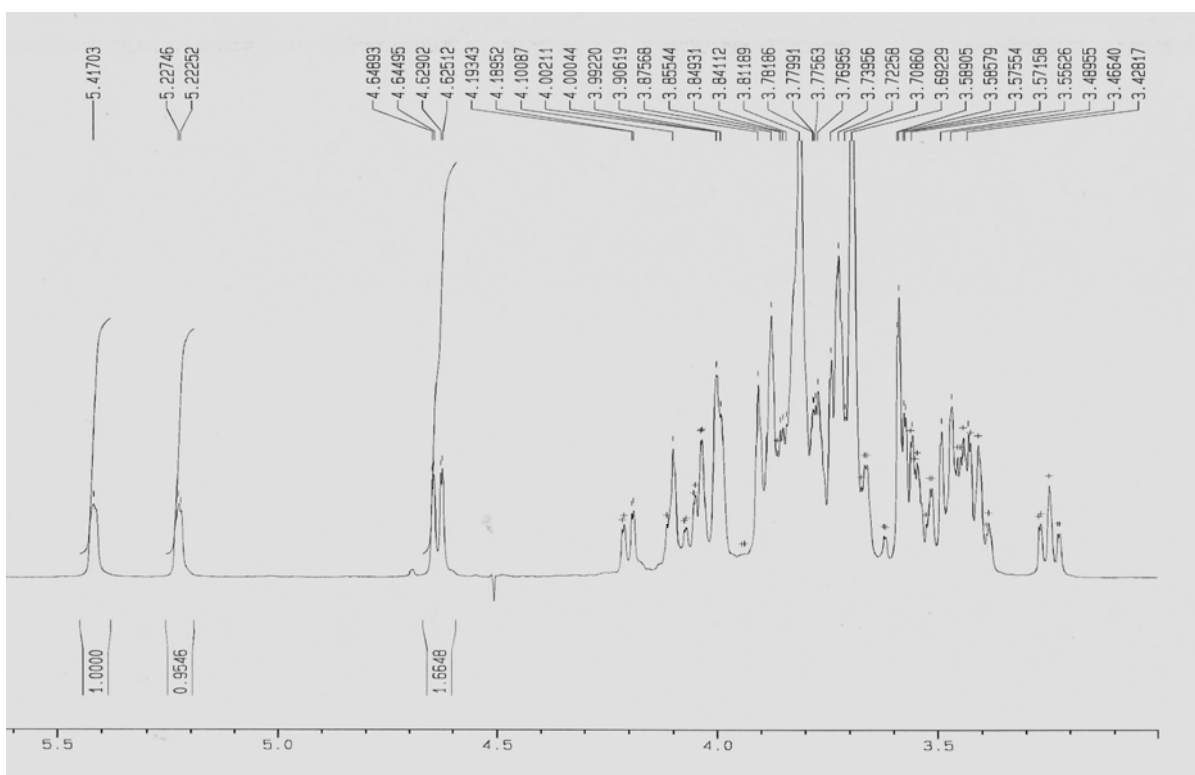
(XXVII)

Essa substância apresentou-se como cristais rômnicos, inodoros, sabor levemente amargo, ponto de fusão 181 -184 °C e rotação óptica +70,30 - +71,50 °. A solubilização não foi possível em clorofórmio, diclorometano, éter etílico, acetona, etanol e metanol, porém foi bastante solúvel em água e dimetilsulfóxido à temperatura ambiente (25 °C).

Sinais entre  $\delta$  59 e 105 no espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  (Figura 12), o qual foi assinalado por DEPT indicando a presença de um carbono anomérico não protonado em  $\delta$  103,3 referente ao C-2 da unidade de  $\alpha$ -frutose e o sinal em 91,7 referente ao C-1 de  $\alpha$ -glucose, são indicativos de um dissacarídeo. Outros carbonos importantes puderam ser assinalados em 61,19 (C-6), 73,99 (C-5), 70,25 (C-4), 73,01 (C-3) e 71,41 (C-2). Os sinais do espectro RMN  $^1\text{H}$  (Figura 13) revelaram a presença de um duplete em  $\delta$  5,4 ( $J=3,9$  Hz), sinal característico para a sacarose referente ao próton em carbono anomérico de C-1 do anel  $\alpha$ -glucopirranose (Liang *et al.*, 2006). Para confirmar a presença da frutose na molécula, entre os sinais para cada próton, destaca-se o singlete em  $\delta$  3,77 para 2H atribuído aos prótons em C-1.



**Figura 12.** Espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  da substância B1.



**Figura 13.** Espectro de RMN  $^1\text{H}$  da substância B1.



## ATIVIDADE FARMACOLÓGICA

### Ensaio biológicos *in vivo*

Testes iniciais desenvolvidos com a fração de alcalóides da agoniada (FAA), administrada em camundongos via intraperitoneal em doses que variam de 0,25 a 1,5 g/kg, provocaram ptose palpebral, dificuldades respiratórias, perda da apreensão das patas, convulsões e morte, com características dose-dependentes. A administração da FAA em doses entre 0,2 a 10 g/kg através de via oral, originou os mesmos efeitos, porém com menor intensidade e maior período de latência. A dose letal para 50% dos animais foi de 1,3 g/kg na administração intraperitoneal e de 8,9 g/kg para a via oral. Na toxicidade aguda das substâncias isoladas uleína e ioimbina, após administração *i.p.*, não foram observados nenhum efeito tóxico envolvendo os limites de dosagem utilizados (0,1-1 mg/g). Guerra e Peters (1991) demonstraram a baixa toxicidade reprodutiva e teratogênica em ratas usando decocto das cascas de *Himatanthus sucuuba*, indicando que seu consumo é seguro na espécie humana para o tratamento de gastrites e hemorróidas. Goloni *et al.* (2005), corroborando com nossos resultados, demonstraram que a ioimbina confere um caráter muito pouco tóxico a *Aspidosperma subincanum Martius*, caracterizando-a praticamente como substância atóxica.

## ATIVIDADE ANTIOXIDANTE

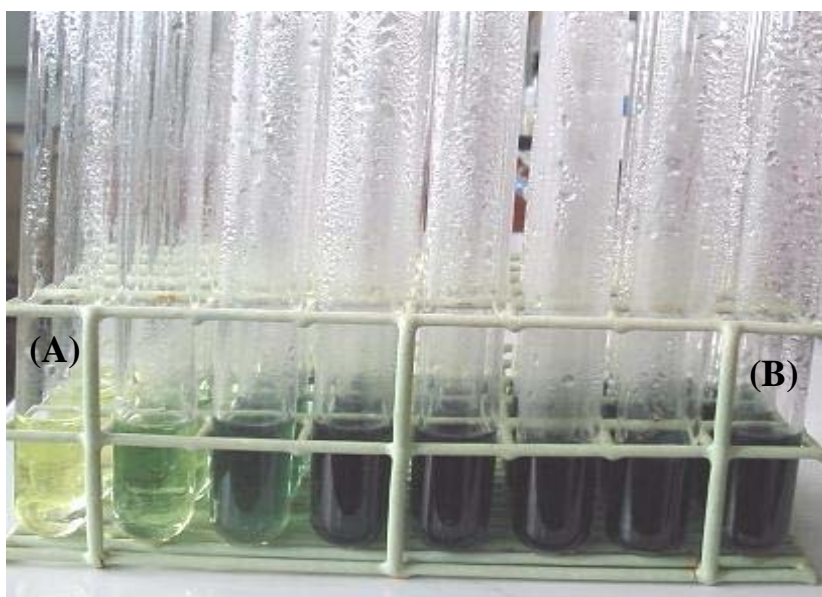
Devido a facilidade das reações, eficiência metodológica, número de citações bibliográficas e disponibilidade dos equipamentos e reagentes, no respectivo estudo, foram utilizados o método da redução do complexo fosfomolibdênico e o da redução do radical livre

DPPH para determinar a atividade antioxidante *in vitro* das frações de alcalóides da agoniada, fração apolar e substâncias isoladas (AL1, AL2 e B1).

Os métodos de interpolação foram também imprescindíveis para a previsão e formulação de equações referentes aos mais diversos fenômenos. A interpolação polinomial de Lagrange é dada pela aproximação de um conjunto de pontos tabelados por um polinômio que melhor se adapte a distribuição desses pontos. Assim, por meio da interpolação foi possível determinar o provável valor de uma grandeza em função da disposição de outros pontos já tabelados anteriormente por medições experimentais.

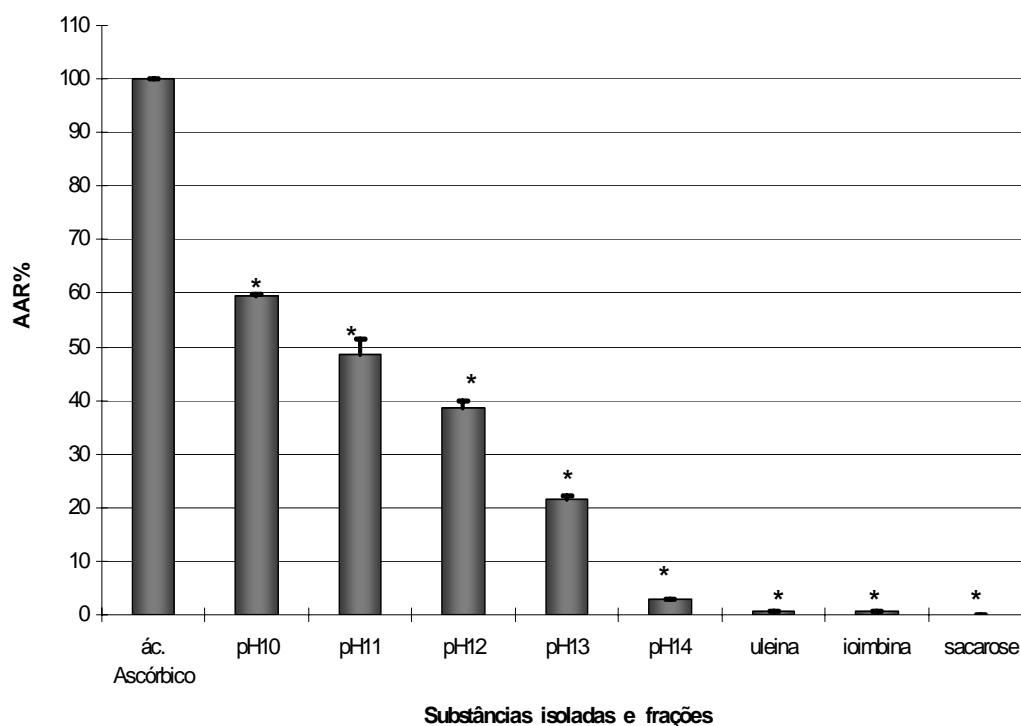
### Ensaio da redução do complexo fosfomolibdênio

Soluções das frações de alcalóides, fração apolar, substâncias AL1, AL2, B1 e padrão de ácido ascórbico (200 µg/ml) foram submetidas a reação de oxi-redução (90 min, 100 °C, n=3-5) e lidas a 695 nm em um espectrofotômetro UV 1601 Shimadzu. As absorvâncias das amostras foram comparadas com a absorvância do padrão de ácido ascórbico. O complexo fosfomolibdênio possui uma coloração amarela, tornando-se verde a medida que se reduz (Figura 14).



**Figura 14.** Ensaio da capacidade antioxidante de extratos em diferentes concentrações após redução com o complexo fosfomolibdênico. As colorações mais claras (A) são resultantes de pouca transferência de elétrons, tornando-se mais escuras à medida que ocorre maior transferência de elétrons (B).

Para a FAA pH10 a média da AAR% (ácido ascórbico) foi igual a  $59,37 \pm 0,55\%$ , enquanto que para a FAA pH11 de  $48,59 \pm 2,75\%$ , para a FAA pH12 foi de  $38,70 \pm 1,18\%$ , para a FAA pH13 de  $21,52 \pm 0,61\%$ , para a FAA pH14 de  $2,74 \pm 0,01\%$ , para a uleína de  $0,59 \pm 0,06\%$ , para a ioimbina de  $0,53 \pm 0,05\%$  e para a sacarose de  $0,018 \pm 0,001\%$ , em relação a 100% do total de atividade atribuída ao ácido ascórbico, conforme demonstrado na Figura 15. A fração apolar não apresentou atividade antioxidante.



**Figura 15.** Representação gráfica da AAR% das frações alcalinizadas das cascas de *H. lancifolius* (200 µg/ml) e substâncias isoladas tendo como base a atividade do ácido ascórbico. Cada coluna representa a média±EPM da porcentagem de AAR% em relação ao padrão de ácido ascórbico (n= 3-5, \* $P \leq 0,001$  vs ácido ascórbico – Holm-Sidak). ANOVA do grupo ( $P \leq 0,001$ ).

A FAA pH10 apresentou maior AAR% em relação ao padrão de vitamina C (ácido ascórbico) comparado as demais frações e substâncias isoladas. Estudos fitoquímicos preliminares (Tabela 3) mostraram presença de substâncias fenólicas nas frações como os taninos. Eles apresentam disponibilidade eletrônica capaz de reduzir o complexo fosfomolibdênico superior ao apresentado pelos alcalóides indólicos uleína e ioimbina. Diversas substâncias fenólicas são importantes antioxidantes, uma vez que possuem esqueleto carbônico propício para a estabilização de radicais livres. Larrauri, Goni *et al.* (1996) verificaram que a posição e o grau de hidroxilação são fatores importantes para a atividade antioxidante das substâncias fenólicas.

Na Figura 15 pode ser observado claramente que a atividade antioxidante da FAA da agoniada diminui de acordo com o aumento do pH, ficando menor ainda quando as amostras testadas tratarem de componentes puros.

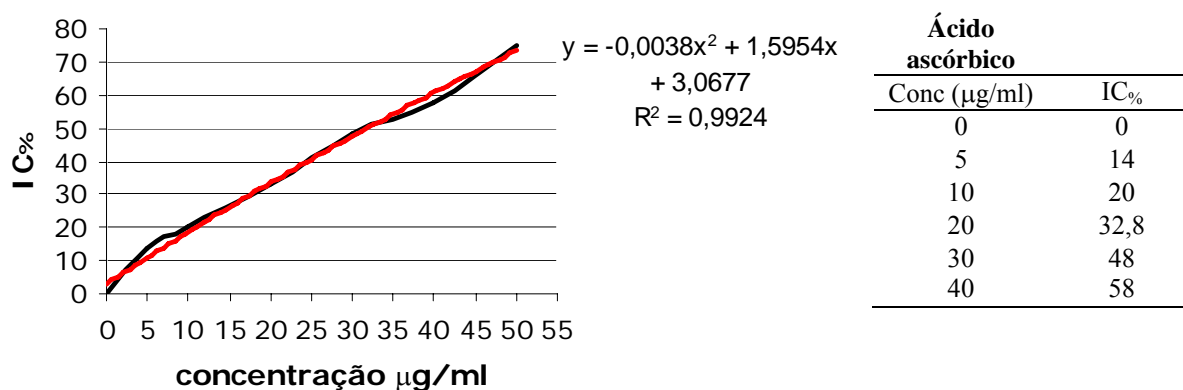
### Ensaio da redução do radical livre 1,1-difenil-2-picrilhidrazila (DPPH)

As mesmas frações e substâncias isoladas utilizadas no ensaio da redução do complexo fosfomolibdênico foram testadas para o ensaio da redução do DPPH. Foram usados como controle positivo o padrão antioxidante do ácido ascórbico. O DPPH é um radical livre estável na forma sólida, solúvel em solventes polares (etanol e/ou metanol) que possui coloração violeta escuro, que ao reduzir, descora-se, tornando-se amarelo. A intensidade da coloração é proporcional à concentração das substâncias presentes com potencial antioxidante (Figura 16).



**Figura 16.** Representação de amostras mais diluídas (violetas) e mais concentradas (amarelas) de ácido ascórbico em solução de DPPH. Os tubos demonstram que a medida que o DPPH sofre redução pelo ácido ascórbico, observa-se mudança da coloração violeta original para uma coloração amarelada, cuja intensidade é proporcional à concentração de ácido ascórbico utilizado medido a 518 nm.

Dessa forma foi determinada a  $IC_{50}$  das FAA e das substâncias isoladas AL1, AL2 e B1. A Figura 17 mostra um ensaio da redução do DPPH, onde o padrão de ácido ascórbico foi tomado como exemplo. Baseado nos valores da  $IC_{\%}$ , foram interpolados gráficos ( $IC_{\%}$  x Conc.  $\mu\text{g/ml}$ ) e através das equações das retas fornecidas foram calculados a  $IC_{50}$ . O resultado considerado é a média $\pm$ EPM de todos os ensaios realizados. A mesma base de cálculos foi aplicada para as demais  $IC_{50}$  (Tabela 4).



**Figura 17.** Representação gráfica dos valores da  $IC_{\%}$  x Conc. ( $\mu\text{g/ml}$ ) do ácido ascórbico comparados a uma linha de tendência polinomial (vermelha).

#### Cálculo da $IC_{50}$ do ácido ascórbico pelo método A:

Pela equação fornecida pelo gráfico da Figura 17, foi estabelecido os seguintes cálculos:

$$y = -0,0038x^2 + 1,5954x + 3,0677$$

$$x = (-b \pm \sqrt{\Delta})/2a, \text{ onde } \Delta = b^2 - 4ac.$$

sendo  $y = 50$  ( $IC_{50}$ ) temos os seguintes valores para  $x$ :

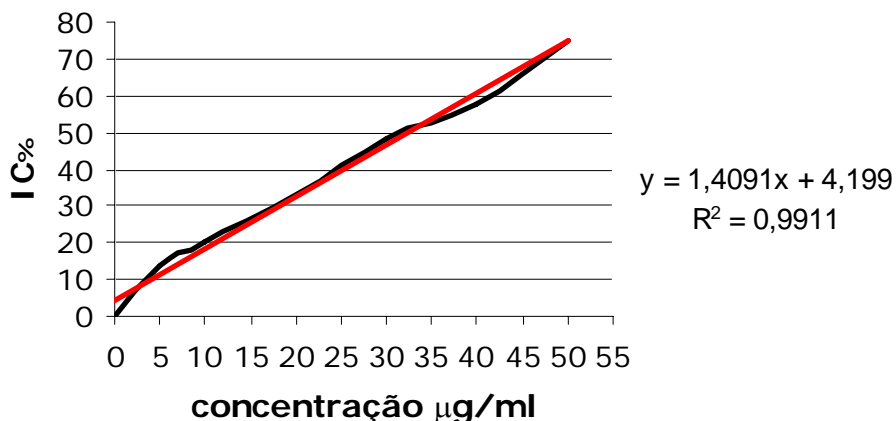
$$x' = 387,75 \mu\text{g/ml}$$

$$x'' = 32,09 \mu\text{g/ml}$$

Dessa forma, foi determinada a  $IC_{50}$  do ácido ascórbico (32,09  $\mu\text{g/ml}$ ). A mesma base de cálculos foi aplicada para todas as demais  $IC_{50}$ .

### **Cálculo da $IC_{50}$ do ácido ascórbico pelo método B:**

Com base nos valores de  $IC_{\%}$ , foram também interpolados gráficos ( $IC_{\%}$  x Conc.  $\mu\text{g/ml}$ ) e através das equações das retas fornecidas, comparado com uma linha de tendência linear, foram calculados os valores da  $IC_{50}$ , como mostra a Figura 18.



**Figura 18.** Representação gráfica dos valores da  $IC_{\%}$  x Conc. ( $\mu\text{g/ml}$ ) do ácido ascórbico comparados com uma linha de tendência linear (vermelha).

Pela equação fornecida pelo gráfico acima, foi estabelecido os seguintes cálculos:

$$y = 1,4091x + 4,199$$

sendo  $y = 50$  ( $IC_{50}$ ) temos o seguinte valor para  $x$ :

$$x = 32,50 \mu\text{g/ml}$$

A mesma base de cálculos foi aplicada para todas as demais  $IC_{50}$  (Tabela 4).

### **Cálculo da IC<sub>50</sub> do ácido ascórbico pelo método C:**

No estudo de projeto e análise de algoritmos, desenvolvem-se técnicas para fazer análise de complexidades. Esta análise tem papel decisivo para o projeto de algoritmos eficientes. Muitas vezes analisar um algoritmo não é uma tarefa fácil, pois envolve manipulações de somas, equações de recorrência e outros cálculos matemáticos de difícil desenvolvimento. Sendo assim os métodos numéricos podem ser uma alternativa de avaliação de complexidades de algoritmos, especialmente nos casos em que a análise exata é difícil ou envolvam outras probabilidades. Assim, nesse trabalho adotamos métodos de interpolações seqüenciais. Os métodos para interpolação são imprescindíveis para a previsão e formulação de equações referentes aos mais diversos fenômenos. A interpolação polinômio é dada pela aproximação de um conjunto de pontos tabelados por um polinômio que melhor se adapte a distribuição desses pontos. Assim, por meio da interpolação é possível determinar o provável valor de uma grandeza em função da disposição de outros pontos já tabelados anteriormente por medições experimentais.

A interpolação polinomial é um processo para estimar valores de uma função  $f(x)$  para valores de argumentos entre  $x_0, \dots, x_n$  sendo conhecidos os valores  $y_0, \dots, y_n$ .

Os métodos de interpolação substituem  $f(x)$  por uma outra função ainda mais fácil de calcular, na maior parte das vezes polinômios; no caso mais simples, um polinômio do primeiro grau. Os valores  $y_0, \dots, y_n$  são substituídos na fórmula polinomial de Lagrange obtendo-se desta forma um algoritmo para interpolar, sendo o resultado uma aproximação de  $f(x)$ .

A partir do polinômio de Lagrange é possível inserir valores na formulação para aplicação de um método de interpolação específica, quando os pontos apresentam-se irregularmente espaçados. O cálculo da IC<sub>50</sub> utilizando o polinômio de Lagrange foi obtido diretamente utilizando um programa, idealizado pelos próprios autores, conforme demonstrado na Figura 19.



Interpolação de Lagrange

$$P_n(x) = \sum_{i=0}^n y_i \prod_{\substack{j=0 \\ j \neq i}}^n \frac{x - x_j}{x_i - x_j}$$

Sair  
Limpar

Pares conhecidos:

x1	y1	x conhecido	y a calcular
x2	y2		
x3	y3		
x4	y4		
x5	y5		

**Figura 19.** Representação do programa utilizado para o cálculo direto da IC<sub>50</sub> tendo como base de cálculo o polinômio de lagrange.

Utilizando o polinômio de Lagrange, e estabelecendo o valor de y=50, o cálculo direto da IC<sub>50</sub> para o ácido ascórbico é de **32,93 µg/ml**. A mesma base de cálculos foi aplicada para todas as demais IC<sub>50</sub> (Tabela 4).

**Tabela 4.** Determinação da IC<sub>50</sub><sup>\*</sup> do padrão antioxidante (ácido ascórbico), frações de alcalóides e substâncias isoladas.

ÁCIDO ASCÓRBICO (PADRÃO)				
[ ] µg/ml	IC%	Equação da reta	Valor R <sup>2</sup>	IC <sub>50</sub>
5	0,58	y= -0,0038x <sup>2</sup> + 1,5954x + 3,0677**	0,9924	32,09±0,35
10	0,54	y=1,4091x + 4,199***	0,9911	32,50±0,17
20	0,45			
30	0,35			
40	0,28			
FAA pH10				
[ ] µg/ml	IC%	Equação da reta	Valor R <sup>2</sup>	IC <sub>50</sub>
10	3,75	y=-0,0007x <sup>2</sup> + 0,3771x + 1,8695**	0,9849	196,33±8,95
25	13,44	y=0,2128x + 5,5261***	0,9468	208,99±7,20
50	22,50			
125	35,88			
250	55,49			

FAA pH11				
[ ] µg/ml	IC <sub>50</sub>	Equação da reta	Valor R <sup>2</sup>	IC <sub>50</sub>
25	12,99	y= -0,0003x <sup>2</sup> + 0,2879x + 3,2816**	0,9948	206,86±0,48
50	18,87		0,9384	265,95±7,64
125	34,02			
250	57,67			
500	78,86			
FAA pH12				
[ ] µg/ml	IC <sub>50</sub>	Equação da reta	Valor R <sup>2</sup>	IC <sub>50</sub>
25	6,99	y= -0,0001x <sup>2</sup> + 0,1714x + 2,0392**	0,9953	390,86±25,78
50	11,73		0,9670	426,59±7,92
125	22,33			
250	35,21			
500	54,77			
FAA pH13				
[ ] µg/ml	IC <sub>50</sub>	Equação da reta	Valor R <sup>2</sup>	IC <sub>50</sub>
50	1,65	y= -0,000006x <sup>2</sup> + 0,0359x + 0,0795**	0,9977	2214,31±55,98
250	9,05		0,9949	1634,02±2,49
500	17,11			
750	22,68			
1000	30,51			
SACAROSE (B1)				
[ ] µg/ml	IC <sub>50</sub>	Equação da reta	Valor R <sup>2</sup>	IC <sub>50</sub>
75	1,14	y= -0,00009x <sup>2</sup> + 0,0428x + 0,5422**	0,9539	8404,44±15,30
250	1,40		0,9949	2485,95±8,50
500	3,05			
750	4,07			
ULEÍNA (AL1)				
[ ] µg/ml	IC <sub>50</sub>	Equação da reta	Valor R <sup>2</sup>	IC <sub>50</sub>
75	0,15	y=0,000001x <sup>2</sup> + 0,0008x + 0,0319**	0,9977	6475,00±25,00
250	0,3		0,8400	27801,05±11,99
500	0,76			
750	1,37			
IOIMBINA (AL2)				
[ ] µg/ml	IC <sub>50</sub>	Equação da reta	Valor R <sup>2</sup>	IC <sub>50</sub>
75	0,13	y=0,0000009x <sup>2</sup> + 0,0008x + 0,0121**	0,9967	7177,77±17,5
250	0,24		0,9812	33361,66±10,27
500	0,68			
750	1,15			

\* Ensaios realizados em triplicata.

\*\* Método A (Tendência polinomial).

\*\*\* Método B (Tendência linear).

Pelos gráficos apresentados de cada fração de alcalóides (FAA) e substâncias isoladas, usando a equação dada por todos os pontos do gráfico (**método A**), pela equação fornecida apenas pelos pontos lineares do gráfico (**método B**) e pela interpolação polinomial de Lagrange

(**método C**), foram calculadas as  $IC_{50}$  ( $\mu\text{g/ml}$ ) das frações de alcalóides e substâncias isoladas, sumarizados na Tabela 5.

**Tabela 5.** Determinação da média da  $IC_{50} \pm EPM^*$  de frações de alcalóides com diferentes pH e substâncias isoladas utilizando três metodologias diferentes.

Frações alcalinizadas e substâncias isoladas	$IC_{50}$ ( $\mu\text{g/ml}$ ) <b>método A</b>	$IC_{50}$ ( $\mu\text{g/ml}$ ) <b>método B</b>	$IC_{50}$ ( $\mu\text{g/ml}$ ) <b>método C</b>
Ácido ascórbico	32,09 $\pm$ 0,35	32,50 $\pm$ 0,17	32,93 $\pm$ 0,17
FAA pH 10	196,33 $\pm$ 8,95 <sup>a</sup>	208,99 $\pm$ 7,20 <sup>a</sup>	205,80 $\pm$ 6,41 <sup>a</sup>
FAA pH 11	206,86 $\pm$ 0,48 <sup>a</sup>	265,95 $\pm$ 7,64 <sup>a</sup>	255,83 $\pm$ 7,16 <sup>a</sup>
FAA pH 12	390,86 $\pm$ 25,78 <sup>a</sup>	426,59 $\pm$ 7,92 <sup>a</sup>	426,80 $\pm$ 9,80 <sup>a</sup>
FAA pH 13	2214,31 $\pm$ 55,98 <sup>b</sup>	1634,02 $\pm$ 2,49 <sup>b</sup>	1643,73 $\pm$ 4,51 <sup>b</sup>
Uleína (AL1)	6475,00 $\pm$ 25,00 <sup>b</sup>	27801,05 $\pm$ 11,99 <sup>b</sup>	27587,21 $\pm$ 0,21 <sup>b</sup>
Ioimbina (AL2)	7177,77 $\pm$ 17,50 <sup>b</sup>	33361,66 $\pm$ 10,27 <sup>b</sup>	31309,51 $\pm$ 0,28 <sup>b</sup>
Sacarose (B1)	8404,44 $\pm$ 15,30 <sup>b</sup>	2485,95 $\pm$ 8,50 <sup>b</sup>	2542,90 $\pm$ 0,88 <sup>b</sup>

\* Ensaio realizado em triplicata. (<sup>a</sup>)  $P < 0,001$ ; (<sup>b</sup>)  $P < 0,05$  em relação ao grupo controle do ácido ascórbico (teste  $t$ ).

Como já demonstrado, quanto menor o valor determinado para a  $IC_{50}$ , mais antioxidante é a substância ou fração testada. Corroborando com o ensaio da redução do complexo fosfomolibdênico a FAA pH 10, calculada pelos métodos A e B, mostrou-se mais ativa que as demais frações e substâncias isoladas, porém com atividade antioxidante inferior ao padrão de ácido ascórbico utilizado. Esse mesmo resultado, observando o método B, não reproduziu-se com relação a sacarose que no ensaio da redução do ácido fosfomolibdênico apresentava uma atividade antioxidante inferior a substância isolada uleína. A uleína e a ioimbina apresentaram valores bastante discrepantes com relação ao método comparativo A e B utilizado.

Sendo assim, faz-se necessária a utilização de um novo método para comprovar qual dos cálculos da  $IC_{50}$  é mais reprodutível e confiável. Vários são os métodos que podemos utilizar para a determinação da atividade antioxidante *in vitro* de extratos vegetais citados na literatura. Pela

interpolação de Lagrange ficou evidenciado que a uleína e a ioimbina, calculada pela interpolação de Lagrange, mostrou-se mais compatível com o método B no qual usou-se os pontos da curva comparando com uma linha de tendência linear. Foi verificado que as substâncias isoladas apresentaram-se menos ativos que as frações alcalinizadas de onde foram extraídos. De fato, observando a estrutura química dos alcalóides isolados uleína e ioimbina, esses não apresentam características antioxidantes por apresentarem pouca disponibilidade de elétrons na sua estrutura. As frações, por apresentarem grupos fenólicos, são muito reativos quimicamente. Como o pKa dos fenólicos é de 9,8, nesse pH apenas 50% das substâncias encontram-se ionizadas, sendo que parte encontra-se na forma livre, sendo solúvel no solvente orgânico utilizado no processo de partição. À medida que as frações tornam-se mais alcalinizadas, as substâncias fenólicas gradativamente transformam-se em sal, sendo portanto menos solúvel no clorofórmio durante o processo de partição, o que explica o melhor rendimento da FAA pH10 e conseguinte melhor atividade antioxidante, embora essa hipótese necessite de estudos complementares.

## QUIMIOTAXIA LEUCOCITÁRIA

### Teste de toxicidade

Os valores apresentados na Tabela 6 representam a média de três ensaios de toxicidade. A viabilidade de leucócitos humanos usados nos experimentos foi superior a 93% na maioria das doses de uleína utilizadas no decorrer das primeiras 6 h ( $3,75 \times 10^{-8}$  -  $3,75 \times 10^{-5}$  mol/l). Somente na dose mais elevada ( $3,75 \times 10^{-4}$  mol/l) a mesma mostrou-se significativamente tóxica para as células. Apesar da uleína não apresentar toxicidade na maioria das doses utilizadas, muitos outros alcalóides indólicos possuem toxicidade que envolve uma variedade de mecanismos. A parte 3-(2

piperidil) indólico existente no alcalóide uleína está presente também em uma grande variedade de outros alcalóides indólicos com atividade citotóxica que apresentam diferentes tipos de esqueletos tais como o estricnano, o aspidospermatano e o plumerano (Kisakurek, Leewenberg *et al.*, 1983). O potente componente citotóxico olivacina e outros alcalóides indólicos foram relatados durante a síntese da uleína e seus derivados por Borris, Lankin *et al.* (1983); Jasztold-Howorko, Croisy *et al.* (2004).

**Tabela 6.** Efeito de diferentes concentrações de uleína sobre leucócitos humanos em tempos variados. A viabilidade é representada pela média±EPM de células tratadas viáveis em relação às células não tratadas com uleína (n=3).

Conc. (mol/l)	Controle	3,75x10 <sup>-8</sup>	3,75x10 <sup>-7</sup>	3,75x10 <sup>-6</sup>	3,75x10 <sup>-5</sup>	3,75x10 <sup>-4</sup>
Tempo (h)						
0	3,66 x 10 <sup>6</sup> ±0,42	4,41 x 10 <sup>6</sup> ±0,07	5,6 x 10 <sup>6</sup> ±0,53	5,34 x 10 <sup>6</sup> ±0,43	3,23 x 10 <sup>6</sup> ±0,35	3,68 x 10 <sup>6</sup> ±0,48
Viabilidade	93,72±1,65	94,86±0,78	96,29±1,42	95,65±0,49	93,73±1,71	94,20±4,94
3	1,30 x 10 <sup>6</sup> ±0,13	1,08 x 10 <sup>6</sup> ±0,06	1,26 x 10 <sup>6</sup> ±0,21	1,54 x 10 <sup>6</sup> ±0,24	1,64 x 10 <sup>6</sup> ±0,08	1,24 x 10 <sup>6</sup> ±0,04
Viabilidade	94,06±1,2	94,43±0,49	91,96±0,31	93,72±0,80	95,11±0,27	76,00±0,60*
6	1,12 x 10 <sup>6</sup> ±0,08	5,40 x 10 <sup>5</sup> ±0,16	7,98 x 10 <sup>5</sup> ±0,70	1,27 x 10 <sup>6</sup> ±0,37	1,17 x 10 <sup>6</sup> ±0,09	1,16 x 10 <sup>6</sup> ±0,02
Viabilidade	93,52±0,77	93,09±1,80	92,65±3,32	93,52±1,11	94,26±1,28	57,85±2,23*
24	7,29 x 10 <sup>5</sup> ±0,08	5,54 x 10 <sup>5</sup> ±0,22	5,93 x 10 <sup>5</sup> ±0,56	1,04 x 10 <sup>6</sup> ±0,49	9,36 x 10 <sup>5</sup> ±3,22	9,88 x 10 <sup>5</sup> ±0,07
Viabilidade	85,86±0,66	84,31±5,18	88,40±1,19	89,70±6,32	89,05±1,15	39,32±1,70*

(\*)  $P < 0,005$  em relação ao grupo controle (teste *t*).

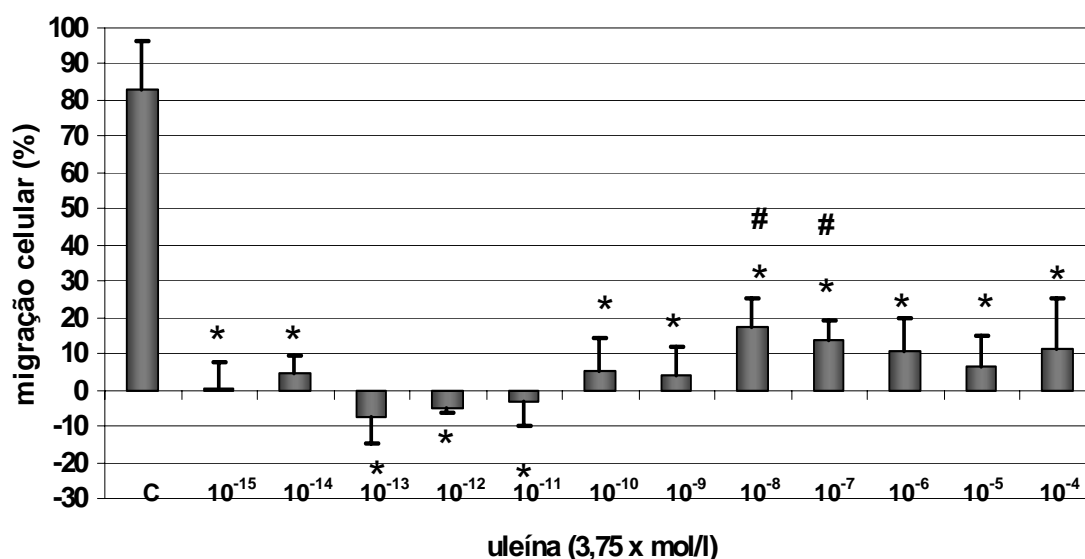
## Teste para verificação da uleína como agente quimioattractor

As substâncias capazes de induzir quimiotaxia em neutrófilos, eosinófilos, basófilos e fagócitos mononucleares, denominadas quimioatractoras, não constituem uma classe específica de compostos e podem ter natureza exógena ou endógena.

Dentre as muitas substâncias capazes de induzir quimiotaxia nos leucócitos, particularmente nos PMN, pode-se citar os peptídeos bioativos. De especial interesse existe a caseína, a fração protéica mais abundante do leite, a qual, desde a primeira demonstração do seu

efeito quimioatrator, vem sendo amplamente utilizada em estudos que investigam a quimiotaxia de várias células (Solymossy, Nagy *et al.*, 1986).

Neste trabalho, utilizou-se a câmara de Boyden como modelo experimental para avaliar se a uleína ( $3,75 \times 10^{-15}$  -  $3,75 \times 10^{-4}$  mol/l) poderia interferir na locomoção de leucócitos humanos, induzindo sua migração ativamente.



**Figura 20.** Efeito da uleína na atividade quimiotática de leucócitos humanos. Leucócitos de sangue periférico ( $10^6$  células/ml) obtidos de voluntários sadios foram induzidos a migrar contra um gradiente de caseína 0,5% (C) ou uleína em diferentes concentrações ( $3,75 \times 10^{-15}$  -  $3,75 \times 10^{-4}$  mol/l), por 90 min à 37 °C em câmara de Boyden, nos quais os compartimentos foram separados por um filtro de polycarbonato com poro de 5  $\mu$ m de diâmetro. Cada coluna representa a média $\pm$ EPM do total de células recuperadas no compartimento inferior em relação ao controle negativo (PBSs), normalizadas em 100% (n=5-6) # $P < 0,05$  (teste *t* ou Mann-Whitney); \* $P < 0,05$  em relação à caseína (teste *t* ou Mann-Whitney). ANOVA do grupo ( $P < 0,05$ ).

Conforme demonstrado na Figura 20, valores muito próximos foram encontrados ao recuperar células no compartimento inferior das câmaras de Boyden para quase todas as doses de uleína testadas quando comparadas com o controle (PBSs), variando entre  $4,3 \pm 7,57\%$  e

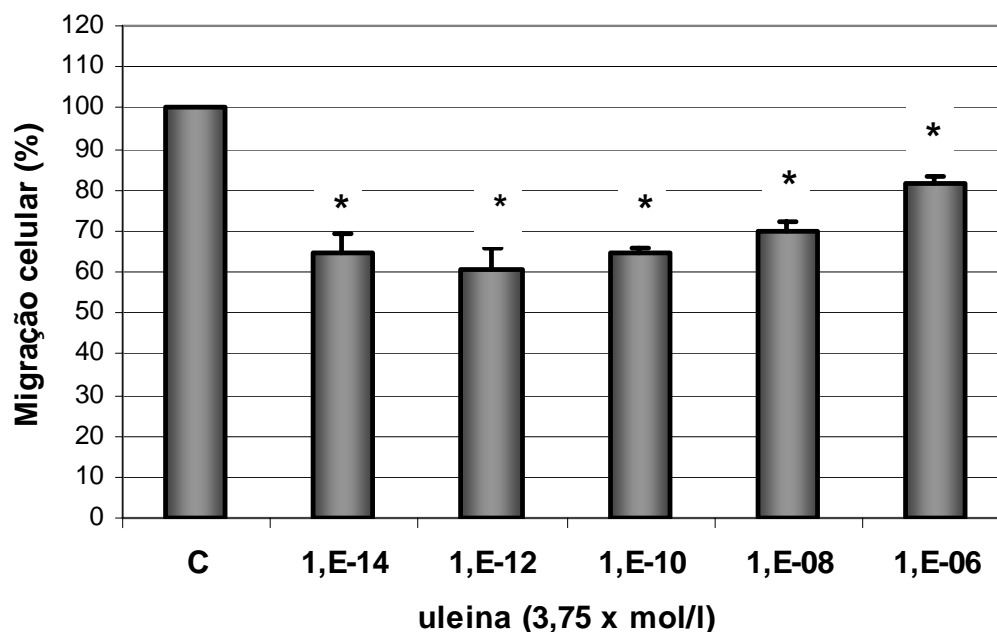
17,2±6,9%. Em contraste, 83,3±10,5% (n=6) foram recuperadas no ensaio no qual o gradiente de caseína 0,5% foi utilizado.

Esses resultados sugerem que a uleína por si só não apresenta atividade quimioatratadora para leucócitos humanos nas condições *in vitro* utilizadas nesse estudo. Somente nas concentrações de  $3,75 \times 10^{-7}$  e  $3,75 \times 10^{-8}$  mol/l a uleína apresentou valores significativos quando comparados ao controle negativo normalizado com PBSs. É relevante acrescentar que nenhuma alteração morfológica nos leucócitos foi observada quando expostos à uleína, contrastando com a forma polarizada assumida após contato com a caseína (Haston e Wilkinson, 1988), corroborando com a sugestão de que a uleína, isolada de *H. lancifolius* não atua como agente capaz de polarizar PMN humanos, a ponto de estimular locomoção.

### Influência da uleína na quimiotaxia leucocitária

O ensaio de quimiotaxia proposto por Boyden e suas variações têm se mostrado útil como metodologia para investigar o efeito de substâncias isoladas de plantas sobre a quimiotaxia de leucócitos (Muller, Reiter *et al.* 1999; Hofbauer, Frass *et al.*, 1999; Shen, Chou *et al.*, 2001).

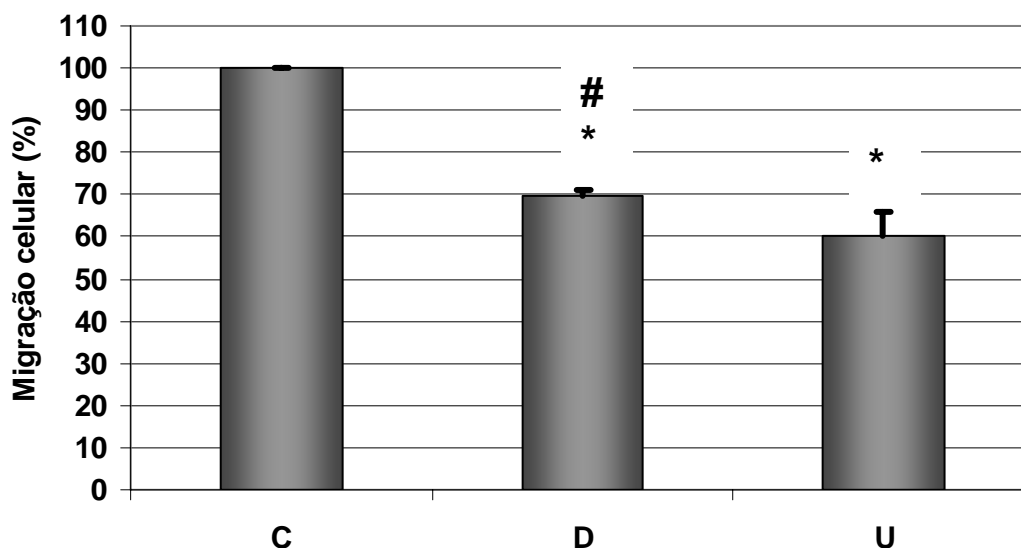
Usando sistema semelhante, investigou-se o comportamento de leucócitos humanos obtidos de indivíduos sadios na quimiotaxia induzida por caseína 0,5% quando previamente tratados, por 30 min à 37 °C, com concentrações de  $3,75 \times 10^{-14}$  –  $3,75 \times 10^{-6}$  mol/l de uleína (Figura 21).



**Figura 21.** Efeito da uleína sobre a quimiotaxia de leucócitos humanos induzidos pela caseína. Leucócitos humanos obtidos de doadores saudáveis foram incubados por 30 min a 37 °C, com as concentrações indicadas de uleína e induzidos a migrar contra um gradiente de caseína 0,5% (p/v) por 90 min a 37 °C, em câmara de Boyden. Cada coluna representa a média±EPM da porcentagem de células migradas em relação àquelas não tratadas (normalizada em 100%), de experimentos independentes submetidos às mesmas condições (n=3-14), \* $P \leq 0,05$  (ANOVA seguido de teste Holm-Sidak).

A exposição de leucócitos humanos a diferentes concentrações de uleína resultou em inibição da migração de PMN até a dose de  $3,75 \times 10^{-12}$  mol/l. Na concentração de  $3,75 \times 10^{-14}$  mol/l,  $64,54 \pm 4,9\%$  (n=3) das células migraram para o compartimento inferior da câmara e esse valor diminuiu para  $60,39 \pm 5,42\%$  (n=8;  $P \leq 0,05$ ) na concentração de  $3,75 \times 10^{-12}$  mol/l, sendo significativos quando comparados à população controle não tratada (Figuras 21 e 22). Assim, a curva dose-resposta de inibição obtida para a uleína demonstrou um perfil em forma de sino invertido (Figura 21), o que sugere a interação da uleína com receptores comuns à caseína, pois bloqueiam a quimiotaxia de PMN por ela induzida. Além disso, nas concentrações mais elevadas testadas, observou-se um aumento da migração celular para o compartimento inferior da câmara de Boyden, sugerindo um efeito dessensibilizador dos receptores.





**Figura 22.** Comparação da eficiência da dexametasona (D) ou uleína (U) sobre a inibição da quimiotaxia de leucócitos humanos estimulada por caseína (C). Leucócitos obtidos de doadores sadios pré-tratados com dexametasona ( $10^{-5}$  mol/l; n=11) ou uleína ( $3,75 \times 10^{-12}$  mol/l; n=14) foram submetidos ao ensaio de quimiotaxia induzida por caseína a 0,5%, em câmara de Boyden, por 90 min à 37 °C. As colunas representam a MÉDIA±EPM de leucócitos recuperados do compartimento inferior da câmara em relação à população controle (não tratada). Comparação estatística foi realizada usando o teste *t* ou Holm-Sidak contra o grupo controle – \* $P \leq 0,05$ . # $P \leq 0,05$  entre D vs U (Holm-Sidak). ANOVA do grupo ( $P \leq 0,05$ ).

Como apresentado na Figura 22, efeito inibitório da DEXA pôde ser observado na migração de PMN quando comparado à respectiva população não tratada (C) (normalizadas em 100%). A percentagem de PMN recuperados no compartimento inferior da câmara de Boyden foi de  $69,49 \pm 1,69\%$  na dose de  $10^{-5}$  mol/l (n=11) corroborando com o descrito por Presibella, Santos *et al.* (2003) que usaram a DEXA  $10^{-5}$  mol/l como referencial de modulação negativa nos ensaios de migração.

Nossos resultados demonstraram que, como já descrito para outras substâncias quimioatractoras de PMN como IL-8 (Yamaguchi, Hirai *et al.*, 1994) e o fMLP (Lomas *et al.*, 1991), a DEXA também foi capaz de inibir, *in vitro*, de forma significativa, a quimiotaxia de PMN induzida por caseína 0,5% nas condições de ensaio testadas, onde  $30,51 \pm 1,69\%$  (n=11;

$P \leq 0,05$ ) das células foram retidas no compartimento superior da câmara de Boyden confirmando os efeitos inibitórios *in vitro* já reportados por Lewis e Van Epps (1983).

Nossos estudos permitiram observar que a uleína mostrou-se eficiente na inibição da quimiotaxia de PMN induzida por caseína 0,5%, inclusive sendo superior ao padrão de DEXA utilizado ( $10^{-5}$  mol/l). Portanto, é possível que a atividade antiinflamatória atribuída a uleína possa estar relacionada à sua capacidade de alterar os mecanismos que envolvem o recrutamento de células envolvidas na resposta inflamatória.

Efeitos inibitórios de plantas medicinais sobre a quimiotaxia têm sido descritos para extratos e substâncias isoladas de várias plantas. O extrato das folhas de *Phyllanthus emblica* L. reduziu cerca de 95% a quimiotaxia de PMN humanos induzidos por LTB<sub>4</sub> e fMLP (Ihantola-Vormisto, Summanen *et al.*, 1997), enquanto que 25% de inibição foi verificado para o extrato de *Allium sativum* (Hofbauer, Frass *et al.*, 2001). Extrato de chá verde em várias concentrações também se mostrou eficiente em inibir a quimiotaxia de PMN através de uma monocamada de células endoteliais (Hofbauer, Frass *et al.*, 1999).

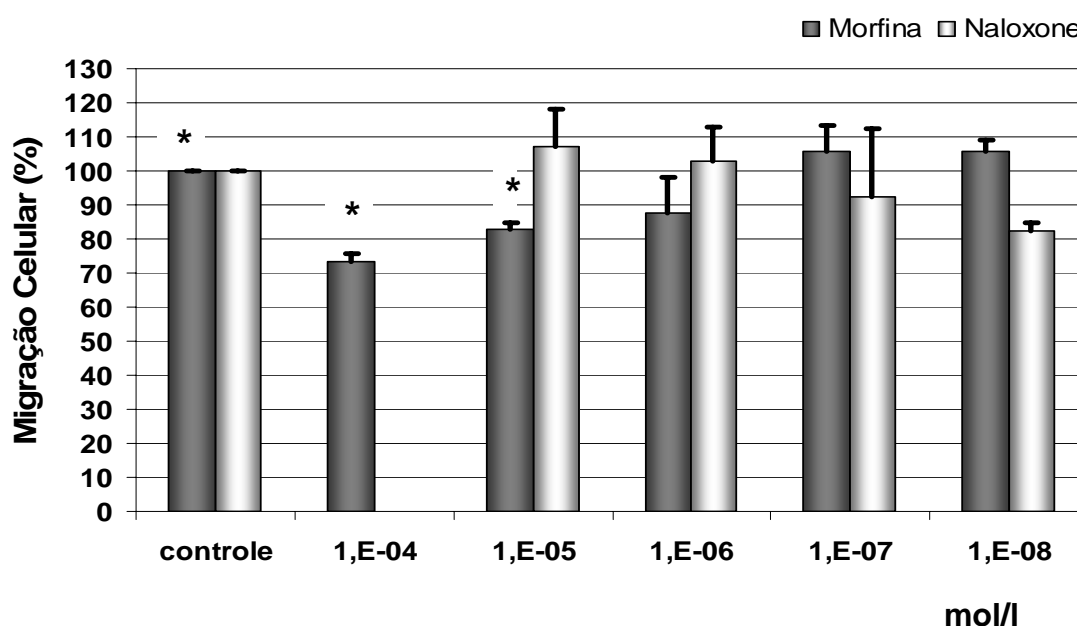
## Estudo do mecanismo de ação da uleína sobre a quimiotaxia

Os resultados de nossos estudos indicaram que a uleína isolada da agoniada apresentou atividade inibitória sobre a quimiotaxia de PMN humanos induzida pela caseína, um peptídeo que interage com receptores opióides, presentes na superfície de PMN (Brantl, Teschemacher *et al.*, 1981; Lewis e Van Epps, 1983; Makman, Bilfinger *et al.*, 1995).

Considerando que a competição entre a caseína e a uleína por receptores presentes nos PMN poderia colaborar para esclarecer o comportamento inibitório observado, foi realizado um estudo para verificar a relação dessa substância com os receptores opióides.

O pré-tratamento de células alvo com agonista ou antagonista tem sido usado como uma das metodologias para se evidenciar a influência de um dado receptor em mediar um efeito (Baggiolini e Moser, 1997). Nesse contexto, decidiu-se investigar o efeito de duas substâncias opióides sobre o comportamento migratório de leucócitos humanos no sistema experimental. Optou-se, então, pela morfina e pela naloxona, os quais medeiam seus efeitos atuando sobre receptores  $\mu$ ,  $\delta$  e  $\kappa$  (Carr, Kim *et al.*, 1988; Makman, Bilfinger *et al.*, 1995).

Os efeitos do tratamento prévio de leucócitos humanos por 10 min a 37 °C, com morfina ( $10^{-8}$  –  $10^{-4}$  mol/l) ou naloxona ( $10^{-8}$  –  $10^{-5}$  mol/l), antes de serem submetidos à migração contra um gradiente de 0,5% de caseína, estão apresentados na Figura 23.

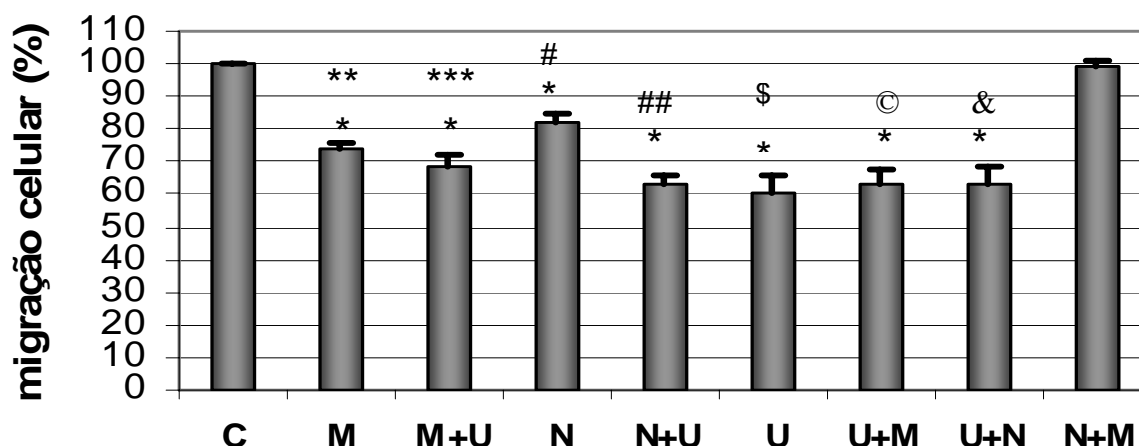


**Figura 23.** Efeito da morfina e naloxona sobre a quimiotaxia de leucócitos humanos induzidos pela caseína. Leucócitos humanos obtidos de doadores sadios foram incubados por 10 min a 37 °C, com diferentes concentrações de morfina ( $10^{-8}$  –  $10^{-4}$  mol/l) ou naloxona ( $10^{-8}$  –  $10^{-5}$  mol/l) e induzidos a migrar contra um gradiente de caseína 0,5% (p/v) por 90 min a 37 °C em câmara de Boyden. Cada coluna representa a média $\pm$ EPM da porcentagem de células migradas em relação àquelas não tratadas (controle) normalizada em 100%, de experimentos independentes submetidos às mesmas condições (n=17-18), \* $P \leq 0,05$  quando comparado ao grupo controle (Holm-Sidak).

Conforme demonstrado, independente do opióide utilizado, ambos apresentaram efeito inibitório sobre a quimiotoxia de leucócitos *in vitro* induzida por caseína, sendo as concentrações de  $10^{-4}$  mol/l e  $10^{-8}$  mol/l de morfina e naloxona, respectivamente, as de maior efeito inibitório. As Figuras 23-24 descrevem os resultados do pré-tratamento de leucócitos humanos com morfina e naloxona independentemente, antes de serem induzidos a migrar contra um gradiente de caseína. Para a morfina ( $10^{-4}$  mol/l),  $73,57 \pm 1,99\%$  (n=18) dos PMN foram recuperados no compartimento inferior do sistema quando comparado à população não tratada (controle). Para a naloxona ( $10^{-8}$  mol/l), os valores encontrados foram de  $82,28 \pm 2,67\%$  (n=17), estando de acordo com o efeito inibitório mostrado para esses opióides usando caseína ou frequentemente outro agente quimiotático (Marcoli, Ricevuti *et al.*, 1988; Pasotti, Mazzone *et al.*, 1992). Em outra série de experimentos (Figura 24), verificou-se que  $10^{-8}$  mol/l de naloxona reverteu o efeito anti-quimiotático da morfina ( $10^{-4}$  mol/l), demonstrando seu efeito antagonista clássico ( $98,82 \pm 2,41\%$ ).

O pré-tratamento agonista/antagonista de células alvo tem sido usado como método para evidenciar a influência de uma rota particular efeito-receptor (Baggiolini e Moser, 1997). O tratamento simultâneo com os opióides mostrou-se estatisticamente significativo, demonstrando o antagonismo da naloxona sendo capaz de reverter os efeitos da morfina (Rang, Dale *et al.*, 2001), diferentemente dos efeitos relatados tanto para a morfina como para a naloxona, independentemente testadas em condições semelhantes ou usando agentes quimioatratores diferentes da caseína, como fMLP ou soro ativado, conforme demonstrados por Marcoli, Ricevuti *et al.* (1988) e Pasotti, Mazzone *et al.* (1992). Além disso, esses resultados são sugestivos de que a caseína interage com os mesmos receptores opióides com os quais a morfina e a naloxona, isoladamente, possui afinidades. De fato, a morfina é uma droga agonista clássica que parece ligar-se especificamente a receptores opióides do subtipo  $\mu_3$ , enquanto a naloxona atua em pelo

menos três tipos de receptores,  $\mu > \delta > \kappa$  de forma seletivamente diferente (Baker e Meert, 2002). Todos esses tipos de receptores já foram descritos na superfície de PMN (Carr, Kim *et al.*, 1988; Makman, Bilfinger *et al.*, 1995).



**Figura 24.** Efeito da uleína (U), morfina (M) e naloxona (N) sobre a quimiotaxia de leucócitos humanos induzida por caseína. Leucócitos de doadores sadios isolados por centrifugação foram pré-tratados com uleína ( $3,75 \times 10^{-12}$  mol/l), morfina ( $10^{-4}$  mol/l) e naloxona ( $10^{-8}$  mol/l), isolados ou em associação, seguido por tratamento com morfina, naloxona ou uleína sendo induzido a migrar contra um gradiente de caseína 0,5% (p/v) em câmara de Boyden, por 90 min, a 37 °C, nos quais os compartimentos foram separados por filtros de policarbonatos com poros de 5  $\mu$ m. Cada coluna representa a média $\pm$ EPM das células recuperadas no compartimento inferior em relação à população não-tratada (C), normalizada em 100% (n=8-18). Comparação estatística foi realizada usando o teste de Tukey ou Holm-Sidak contra o grupo controle - \* $P \leq 0,05$ ;  $P \leq 0,05$  entre \*\*M vs N ou N+M (Holm-Sidak); \*\*\* $P \leq 0,05$  entre M+U vs N ou N+M (Holm-Sidak); # $P \leq 0,05$  entre N vs N+U ou U ou U+M ou U+N ou N+M (Holm-Sidak); ## $P \leq 0,001$  entre N+U vs N+M (Holm-Sidak); \$ $P \leq 0,001$  entre U vs N+M (Holm-Sidak); ©  $P \leq 0,001$  entre U+M vs N+M (Holm-Sidak); & $P \leq 0,001$  entre U+N vs N+M (Holm-Sidak). ANOVA do grupo ( $P \leq 0,05$ ).

Para investigar a possibilidade de que o efeito inibitório na migração de PMN causado pela uleína pudesse ser mediado via receptor opióide, numa primeira série de experimentos, leucócitos humanos foram tratados com morfina ( $10^{-4}$  mol/l) ou naloxona ( $10^{-8}$  mol/l) independentemente por 10 min a 37 °C e subsequente com uleína ( $3,75 \times 10^{-12}$  mol/l) por 30 min a 37 °C, antes de serem submetidos ao ensaio de migração induzido pela caseína 0,5%. Na

segunda série de experimentos, alterou-se a ordem dos tratamentos, sendo os leucócitos tratados primeiramente com uleína e, depois, com a morfina ou com naloxona.

Enquanto o tratamento com uleína mostrou uma diminuição significativa da migração de PMN ( $60,39 \pm 5,42\%$ ;  $n=8$ ), o tratamento prévio com a morfina ou com a naloxona levaram a uma redução dessa atividade, quando  $68,94 \pm 2,81\%$  ( $n=11$ ) e  $63,30 \pm 2,29\%$  ( $n=11$ ) de PMN, respectivamente, foram recuperados. Ao tratar os leucócitos primeiramente com uleína e, em seguida, com morfina ou naloxona, o efeito inibitório observado foi semelhante ao obtido com a combinação anterior, com uma porcentagem de  $62,74 \pm 4,97\%$  ( $n=8$ ) e  $63,36 \pm 4,74\%$  ( $n=10$ ) respectivamente de PMN recuperados.

Nos experimentos em que os leucócitos foram primeiramente tratados com os opióides, e em seguida, com a uleína, observou-se uma inibição de 31,06% e 36,70% para morfina e naloxona, respectivamente, sendo superior a inibição apresentada quando os leucócitos foram tratados somente com morfina (26,43%) ou naloxona (17,72%). No tratamento inicial de leucócitos com uleína e, posteriormente, com os opióides, a inibição observada foi de 37,26% para a morfina e 36,64% para naloxona, sendo bastante semelhante em relação ao tratamento leucocitário de forma contrária, isso é, com tratamento prévio com os opióides.

Com essas duas séries de experimentos, foi possível observar que o tratamento prévio com morfina ou naloxona parece não ter impedido que a uleína exercesse seu efeito inibitório sobre a quimiotaxia dos PMN e vice-versa, sugerindo que o efeito dessa substância isolada na migração dos neutrófilos possa também envolver receptores opióides, inclusive, de diferentes tipos diferentes dos apresentados pela morfina, evidenciado pelo aumento do efeito inibidor quando os leucócitos são primeiramente tratados com uleína e após com morfina. A uleína também não é considerado um antagonista da morfina ou da naloxona porque não reverte o efeito desses.

O conjunto de resultados apresentado nesse trabalho revelaram alguns aspectos interessantes e desconhecidos com relação à atividade farmacológica da *H. lancifolius*. Embora essa planta seja recentemente bastante estudada por causa de seus amplos e benéficos efeitos medicinais, não há relatos referentes à forma de ação de uma das suas substâncias principais, a uleína, sobre a atividade migratória de células que participam direta e ativamente da resposta migratória. Quimiotaxia é um processo complexo e nenhum ensaio simples fornece toda informação necessária, sendo recomendados outros ensaios devidos, principalmente, ao fato de um possível envolvimento de receptores não opióides ou pela simples mudança de conformação desses receptores, uma vez que sempre que a uleína foi adicionada ocorreu um padrão de inibição.

O produto fitoterápico denominado Haguniada®, cuja composição contém entre outras plantas cascas de *Himatanthus lancifolius* (*Plumeria*), são utilizados por sua ação antiinflamatória e antiespasmódica sobre o útero, demonstrado em laboratório, justificando sua indicação popular nas dismenorréias.

### Teste da peritonite induzida por carragenina

A peritonite avalia a migração leucocitária, por meio da contagem de leucócitos ( $\times 10^7/\text{ml}$ ), presentes no exsudato liberado na cavidade peritoneal, após administração da carragenina. Na Figura 25 observa-se que o grupo que induziu a inflamação (carragenina) e sem tratamento apresentou migração de células para o líquido peritoneal de  $51,07 \pm 1,08\%$ ,  $70,58 \pm 0,93\%$  e  $61,07 \pm 0,85\%$  quando comparado aos grupos controle, dexametaxona e uleína, respectivamente, mostrando a eficácia do agente inflamatório.

A uleína reduziu o número de leucócitos do exsudato da cavidade peritoneal agredida pela carragenina em 20,43%, em relação ao controle (PBS), demonstrando assim o impedimento da migração leucocitária, ou talvez mais provavelmente, essa substância atue apenas inibindo os mediadores químicos responsáveis pelo processo edematogênico, já que a dexametasona apresentou uma redução *in vivo* de 39,97% (Figura 25). A uleína não apresentou diferença significativa ao tratado com o fármaco dexametasona *in vivo*. O mecanismo pelo qual este fármaco comercialmente vendido atua na ação antiinflamatória é baseado no bloqueio da enzima fosfolipase A, responsável pela retirada do ácido araquidônico da membrana celular, para produção de prostaglandinas, tromboxanas e leucotrienos (Rang, Dale *et al.*, 2001). A carragenina tem como característica produzir inflamação por liberação de prostaglandinas.

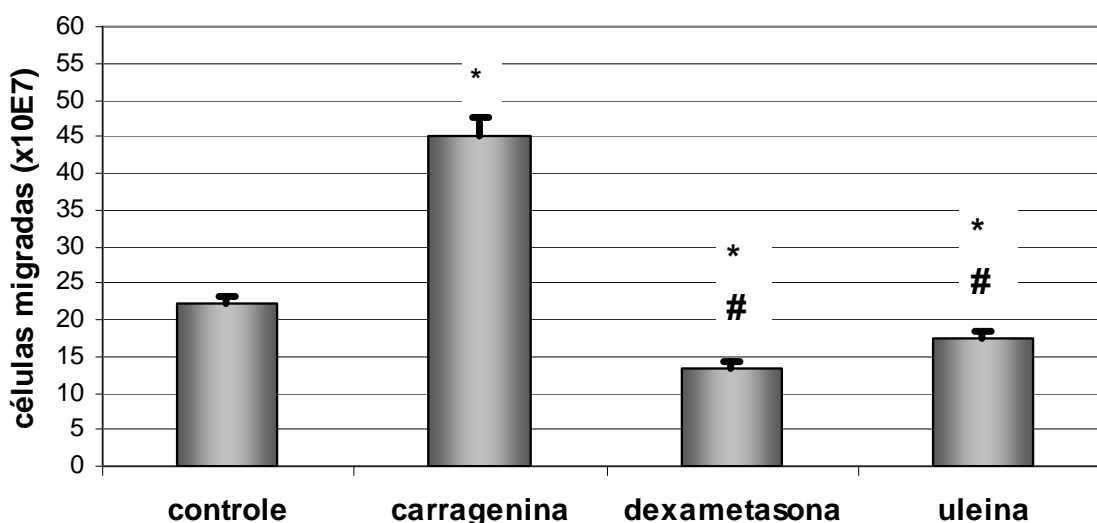
Diante do exposto não se pode afirmar que a uleína tenha o mesmo mecanismo da dexametasona, pois a inflamação depende de vários fatores como quimiotaxia, fagocitose, formação de ribossomos entre outros, podendo a substância isolada atuar em qualquer um destes mecanismos. Como demonstrado nesse trabalho a uleína possui atividade antiinflamatória podendo ou não apresentar o mesmo mecanismo dos antiinflamatórios esteroidais. A uleína (0,5 g/kg, *i.p.*) produziu estatisticamente uma significativa inibição da migração de leucócitos para o líquido peritoneal induzido por carragenina 1%. A uleína demonstrou também em estudos anteriores, agir em nível de receptores opióides em leucócitos humanos sem efeitos tóxicos para as células até a concentração de  $3,75 \times 10^{-5}$  mol/l.

Os medicamentos antiinflamatórios esteroidais são indicados para o controle da inflamação, como a dexametasona por reduzirem a dor, calor e o rubor. São os medicamentos de primeira escolha no caso de doenças auto-imunes como lúpus, artrite reumatóide e psoríase, devido atividade imunossupressora (Rang, Dale *et al.*, 2001).

Rattmann, Terluk *et al.* (2005) demonstraram que doses de 25 a 50 mg/kg da fração alcaloídica da agoniada (FAA) via oral, reduziram o edema de pata de ratos induzidos por



carragenina a 1%, porém não reduziram edema induzido por dextrana 1% (via intraplantar). A dose de 100 mg/kg de FAA (via oral) não interferiu na migração leucocitária aguda em camundongos pela administração intraperitoneal de 0,1 ml/10 g de ovo albumina. Nossos resultados abordando os alcalóides isolados dessa FAA corroboram com esses resultados evidenciando ação antiinflamatória e analgésica, sem envolvimento de atividade anti-histamínica da FAA.



**Figura 25.** Efeito da administração intraperitoneal da dexametasona (0,5 mg/kg, *i.p.*) e uleína (0,5 g/kg, *i.p.*) sobre a migração leucocitária para o líquido peritoneal ( $\times 10^7/\text{ml}$ ) induzido pela injeção de carragenina 1%. Cada coluna representa a média $\pm$ EPM das células migradas para o líquido peritoneal ( $n=10$ ), \* $P<0,01$  quando comparados ao grupo controle; #  $P<0,05$  quando comparados ao grupo carragenina (ANOVA, seguida do teste de Tukey).

De Miranda, Silva *et al.* (2000) demonstraram que a fração hexânica de *H. sucuuba* inibiu a formação de edema de pata de rato em 35,9% em uma dose de 200 mg/kg (v.o), mas nenhuma atividade foi observada com 100 mg/kg (v.o). Os triterpenos presentes na fração hexânica foram identificados como lupeol acetato,  $\alpha$ -amirina cinamato e lupeol cinamato. A fração contendo somente cinamato inibiu o edema de pata de rato e a constrição abdominal em 50, 40 e 57,9%, respectivamente, na concentração de 100 mg/kg (v.o). Dentre todas as frações

estudadas, a fração contendo somente cinamatos mostrou maior atividade antiinflamatória, os quais sugerem que essas substâncias foram as principais responsáveis pela atividade do extrato descrita. Silva *et al.* (1998b) também demonstraram previamente que a FAA obtida das cascas de *H. lancifolius* possuíam atividade antiinflamatória *in vivo*, porém não demonstraram a principal substância responsável por essa atividade.

As atividades demonstradas pela uleína *in vivo*, mostraram serem capazes de exercer efeito antiinflamatório na fase aguda do processo inflamatório, pois o desenvolvimento da inflamação induzida por carragenina corresponde ao evento nessa mesma fase, mediada por histamina, bradiquinina e prostaglandina, corroborando com o descrito por Vinegar, Truax *et al.* (1976).

## ENSAIO ANTIMICROBIANO

Constituintes polifenólicos, flavonóides, taninos, ésteres fenólicos simples entre outros, podem desempenhar importantes atividades antimicrobianas, é o caso da quercetina, rutina, apigenina (Basile, Sorbo *et al.*, 2000) e remangiflavanonas A e B (Deng, Lee *et al.*, 2000) frente a cepas de bactérias gram positivas e gram negativas. Os alcalóides também apresentam uma vasta atividade sobre patógenos humanos. Estudo fitoquímico revelaram a presença de alguns desses constituintes nas cascas de *Himatanthus lancifolius* (Tabela 3).

Ensaio realizados a partir da fração apolar, frações de alcalóides pH10,11,12,13,14 e substâncias isoladas (Esquema 7 e 8) dissolvidas em dimetilsulfóxido (DMSO) nas concentrações de 31,25, 62,5, 125, 250, 500 e 1000 µg/ml mostraram considerável atividade contra patógenos humanos gram positivo e gram negativo tais como *Staphylococcus aureus*, incluindo cepas MRSA, *Staphylococcus epidermides*, *Escherichia coli* (Tabela 7). As mesmas frações não

demonstraram nenhuma atividade contra *Pseudomonas aeruginosa* e *Morganella morganii*. A fração de alcalóide pH10 demonstrou uma melhor atividade contra todos os microrganismos testados. A fração apolar não demonstrou nenhuma atividade contra os mesmos microrganismos. A uleína possui uma significativa atividade contra cepas MRSA nas concentrações de 500 e 1000 µg/ml (Tabela 8). A substância (AL2) e a sacarose (B1) não apresentaram atividade contra os mesmos microrganismos testados.

Com a finalidade de expandir os estudos referentes a atividade antimicrobiana foram realizados testes de susceptibilidade pelo método de difusão em disco, padronizado pelo NCCLS/2002 (Kirby-Bauer), usando a fração de alcalóides livres pH10, pelo fato de ter apresentado melhor atividade que as demais frações anteriormente testadas. Foram abordados uma maior quantidade de patógenos humanos gram positivo e gram negativo, inclusive cepas caninas. As culturas bacterianas foram obtidas através de cepas padrões (ATCC) e cepas recentemente isoladas e identificadas de amostras clínicas humanas. DMSO e etanol foram utilizados como solvente para dissolver a FAA usada no teste (pH10), para verificar se há diferença de difusão no meio de cultura. Os resultados indicaram que a FAA pH10 é ativa contra patógenos humanos gram positivo e gram negativo tais como *S. aureus* incluindo cepas MRSA, *S. epidermidis*, *E. faecalis*, *E. coli*, *P. mirabilis*, *P. agglomerans*, *A. baumannii* e também patógeno animal tal como *S. aureus* canino (Tabela 9 e 10). Não existiu diferença significativa entre os solventes utilizados.

**Tabela 7.** Resultados da análise antimicrobiana da fração apolar, FAA pH 10,11,12,13 e 14 das cascas de *Himatanthus lancifolius* dissolvidas em DMSO<sup>a</sup>.

Frações (pH)		Zona de inibição(mm)*							
<i>S. aureus</i> ATCC25923	G+	31,25µg/ml	62,50µg/ml	125µg/ml	250µg/ml	500µg/ml	1000µg/ml	Vanc.	Chlo.
10		-	-	11	15	17	18	21	27
11		-	-	-	10	15	18	21	27
12		-	-	-	-	-	-	21	27
13		-	-	-	-	-	-	21	27
14		-	-	-	-	-	-	21	27
Apolar		-	-	-	-	-	-	21	27
<hr/>									
<i>S. aureus</i> MRSA	G+								
10		-	7	15	17	20	24	25	NT
11		-	-	-	12	13	17	25	NT
12		-	-	9	13	16	21	25	NT
13		-	-	-	-	-	-	25	NT
14		-	-	-	-	7	16	25	NT
Apolar		-	-	-	-	-	-	25	NT
<hr/>									
<i>S. epidermides</i>	G+								
10		9	10	13	16	20	23	24	29
11		-	-	-	13	17	20	24	29
12		-	-	-	11	13	20	24	29
13		-	-	-	-	-	7	24	29
14		-	-	-	-	7	12	24	29
Apolar		-	-	-	-	-	-	24	29
<hr/>									
<i>E. coli</i> ATCC 25922	G-							A+S	Chlo.
10		-	-	-	8	10	16	23	27
11		-	-	-	-	-	10	23	27
12		-	-	-	-	7	10	23	27
13		-	-	-	-	-	-	23	27
14		-	-	-	-	-	-	23	27
Apolar		-	-	-	-	-	-	23	27

<sup>a</sup>Valores médios de três replicatas; G: Reação bacteriana ao gram; Vanc: Vancomicina (30 µg/ml); Chlo: Cloranfenicol (30 µg/ml); A+S: Ampicilina e Sulbactam (30 µg/ml) -: sem inibição; NT: não testado; \* incluindo o diâmetro do disco (6mm).

**Tabela 8.** Resultado da análise da uleína dissolvida em DMSO<sup>a</sup> contra microrganismos gram positivos e gram negativos.

Uleína		Zona inibição (mm)*							
Microrganismos		31,25µg/ml	62,50µg/ml	125µg/ml	250µg/ml	500µg/ml	1000µg/ml	Vanc.	Chlo.
<i>E. coli</i> ATCC 25922	G-	-	-	-	-	8	12	NT	27
<i>S. epidermides</i>	G+	-	-	7	7	9	11	NT	19
<i>E. faecalis</i> ATCC29212	G+	-	-	-	-	-	-	NT	13
<i>S. aureus</i> ATCC25923	G+	-	-	-	-	-	9	NT	27
<i>S. aureus</i> MRSA	G+	-	-	7	9	12	16	25	NT

<sup>a</sup>Valores médios de três replicatas; G: Reação bacteriana ao gram; Vanc: Vancomicina (30 µg/ml); Chlo: Cloranfenicol (30 µg/ml); -: sem inibição; NT: não testado; \* incluindo o diâmetro do disco (6 mm).

**Tabela 9.** Atividade antimicrobiana da FAA pH 10 de *Himatanthus lancifolius* dissolvida em DMSO<sup>a</sup> contra patógenos gram positivos e gram negativos.

Microrganismos	Zona de inibição (mm)*						
		62,5µg/ml	125 µg/ml	250µg/ ml	500µg/ml	1000µg/ml	Chlo
<i>S.aureus</i> –ATCC25923	G +	-	11	15	17	18	27
<i>S.aureus</i> – ATCC29213	G +	-	-	7	12	16	24
<i>Staphylococcus aureus</i> **	G +	-	-	9	14	17	28
<i>S.aureus</i> – MRSA	G +	7	15	17	20	24	25 <sup>b</sup>
<i>E. faecalis</i> - ATCC29212	G +	-	-	-	10	15	29
<i>Streptococcus pneumoniae</i>	G +	-	-	-	9	13	25
<i>Staphylococcus epidermides</i>	G +	10	13	16	20	23	29
<i>K. pneumoniae</i> - ATCC700603	G -	-	-	-	-	7	15
<i>E. coli</i> - ATCC352181B	G -	-	-	-	7	10	23 <sup>c</sup>
<i>E. coli</i> - ATCC25922	G -	-	-	8	10	16	23 <sup>c</sup>
<i>P. aeruginosa</i> - ATCC27853	G -	-	-	-	-	-	13
<i>Proteus mirabilis</i>	G -	-	-	-	-	7	30
<i>Morganella morganii</i>	G -	-	-	-	-	-	-
<i>Pantoea agglomerans</i>	G -	-	-	-	8	13	-
<i>Acinetobacter baumannii</i>	G -	-	-	-	7	16	-

<sup>a</sup>Valores médios de três replicatas; G: Reação bacteriana ao gram; <sup>b</sup>Vancomicina (30 µg/ml); Chlo: Cloranfenicol (30 µg/ml); <sup>c</sup>Ampicilina e Sulbactam (30 µg/ml ) -: sem inibição; NT: não testado; \* incluindo o diâmetro do disco (6mm); \*\* cepa canina.

**Tabela 10.** Atividade antimicrobiana da FAA pH10 de *Himatanthus lancifolius* dissolvida em etanol<sup>a</sup> contra patógenos gram positivo e gram negativo.

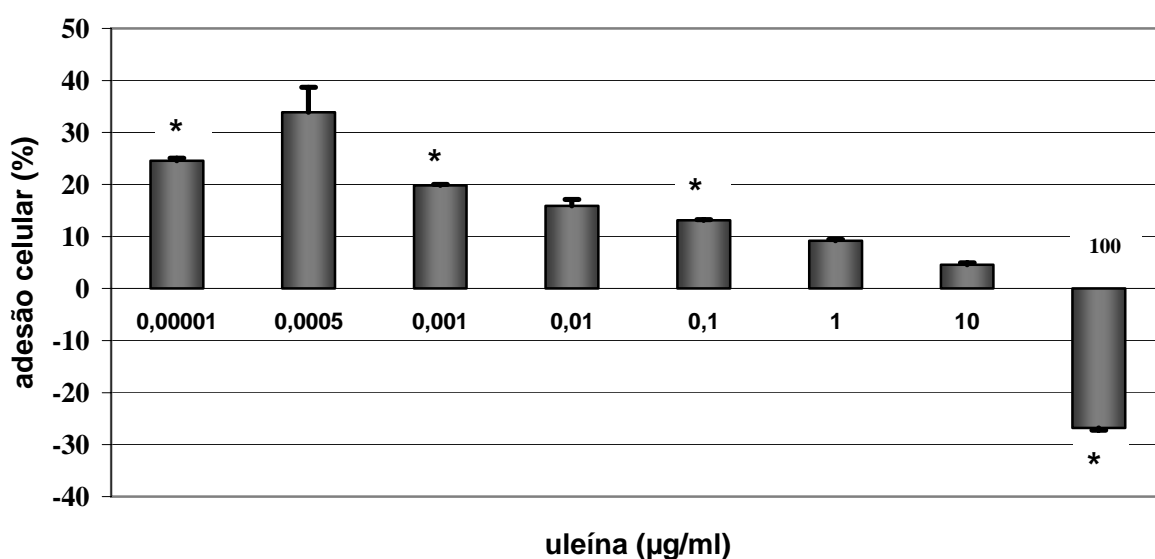
Microrganismos		Zona de inibição (mm)*					
		62,5 µg/ml	125 µg/ml	250 µg/ml	500 µg/ml	1000 µg/ml	Chlo
<i>S.aureus</i> –ATCC25923	G +	-	-	10	15	16	27
<i>S.aureus</i> – ATCC29213	G +	-	-	7	10	13	24
<i>Staphylococcus aureus</i> **	G +	-	-	9	14	17	28
<i>S.aureus</i> – MRSA	G +	7	12	15	18	20	25 <sup>b</sup>
<i>E. faecalis</i> - ATCC29212	G +	-	-	-	10	14	29
<i>Streptococcus pneumoniae</i>	G +	-	-	-	9	14	25
<i>Staphylococcus epidermides</i>	G +	-	-	10	16	20	30
<i>K.pneumoniae</i> - ATCC700603	G -	-	-	-	-	7	15
<i>E. coli</i> - ATCC352181B	G -	-	-	-	-	9	23 <sup>c</sup>
<i>E. coli</i> - ATCC25922	G -	-	-	7	10	15	23 <sup>c</sup>
<i>P. aeruginosa</i> - ATCC27853	G -	-	-	-	-	-	13
<i>Proteus mirabilis</i>	G -	-	-	-	-	7	30
<i>Morganella morganii</i>	G -	-	-	-	-	-	-
<i>Pantoea agglomerans</i>	G -	-	-	-	8	10	-
<i>Acinetobacter baumannii</i>	G -	-	-	-	8	10	-

<sup>a</sup>Valores médios de três replicatas; G: Reação bacteriana ao gram; <sup>b</sup>Vancomicina (30 µg/ml); Chlo: Cloranfenicol (30 µg/ml); <sup>c</sup>Ampicilina e Sulbactam (30 µg/ml ) -: sem inibição; NT: não testado; \* incluindo o diâmetro do disco (6 mm); \*\* cepa canina.

Preparações das cascas de *Himatanthus lancifolius* são usadas na medicina tradicional para o tratamento de várias doenças de pele de origem bacteriana (Correa, 1984). Esta atividade pode ser atribuída principalmente à presença de alcalóides indólicos, principal metabólito secundário presente nesse gênero. Atividade antimicrobiana de alcalóides isolados já havia sido citada em trabalhos de Sohrab, Chowdhury *et al.* (2004) que descreveram uma moderada atividade antibacteriana contra bactérias gram positiva e gram negativas na dose de 200 µg/disco.

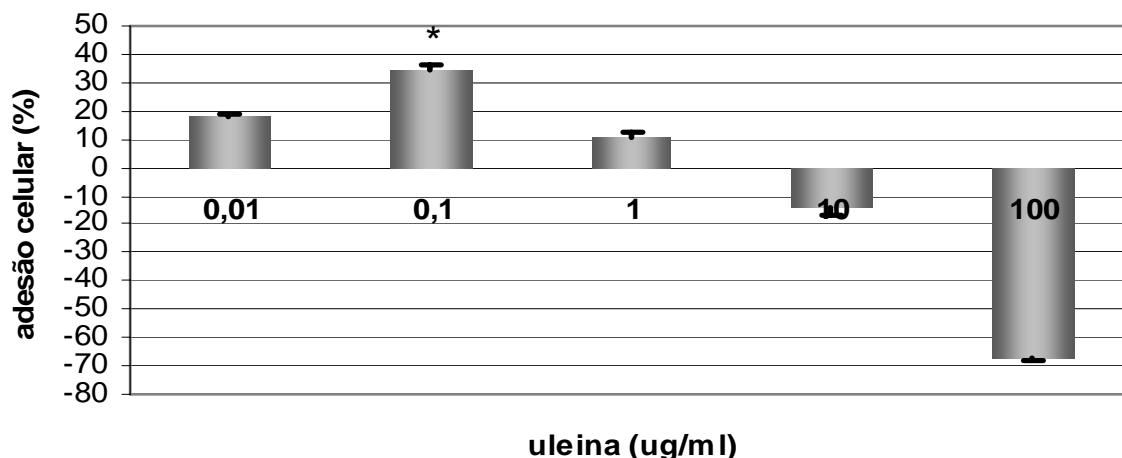
## TESTE DE ADESÃO CELULAR

Os resultados apresentados na Figura 26 demonstram aumento na adesão de células melanoma B16F10 promovido pela maioria das concentrações de uleína testadas no ensaio ( $10^{-5}$ – $10 \mu\text{g/ml}$ ), exceto na concentração  $100 \mu\text{g/ml}$ , cuja adesão foi inferior ao apresentado pelo controle, contendo células não estimuladas. A máxima atividade foi observada em  $5 \times 10^{-4} \mu\text{g/ml}$ , representando  $33,89 \pm 4,78\%$  ( $n=10$ ) acima do controle utilizado.



**Figura 26.** Efeito da uleína na adesão celular de células melanoma de camundongos (B16F10), na ausência de matriz extracelular. Células B16F10 ( $10^6$  células/ml) obtidos de American Type Culture Collection (cat # ATCC CRL-6475) foram induzidas a aderir na presença de uleína, em diferentes concentrações, por 90 min à  $37^\circ\text{C}/5\%$  de tensão de  $\text{CO}_2$ . Cada coluna representa a  $\text{media} \pm \text{EPM}$  da porcentagem de células aderidas e medida em espectrofotômetro a 540 nm, em relação ao controle, normalizada em 100% ( $n=10$ ),  $*P \leq 0,05$  em relação ao controle (Holm-Sidak). ANOVA do grupo ( $P \leq 0,05$ ).

Nas RAEC, a adesão máxima foi observada na concentração de  $0,1 \mu\text{g/ml}$  de uleína, onde houve um aumento na adesão de  $34,78 \pm 1,42\%$  ( $n=5$ ;  $*P=0,132$ ), conforme demonstrado na Figura 27, sendo que nas concentrações de 10 e  $100 \mu\text{g/ml}$  a uleína não favoreceu a adesão celular nessa linhagem celular.



**Figura 27.** Efeito da uleína na adesão celular de células endoteliais de aorta de coelho (RAEC), na ausência de matriz extracelular. Células RAEC ( $10^6$  células/ml) foram induzidas a aderir na presença de uleína, em diferentes concentrações (0,01 – 100  $\mu\text{g/ml}$ ), por 90 min à 37 °C/5% de tensão de  $\text{CO}_2$ . Cada coluna representa a  $\text{media} \pm \text{EPM}$  da porcentagem de células aderidas e medida em espectrofotômetro a 540 nm, em relação ao controle, normalizada em 100% ( $n=5$ ). \* $P \leq 0,05$  em relação ao controle (Holm-Sidak). ANOVA do grupo ( $P \leq 0,05$ ).

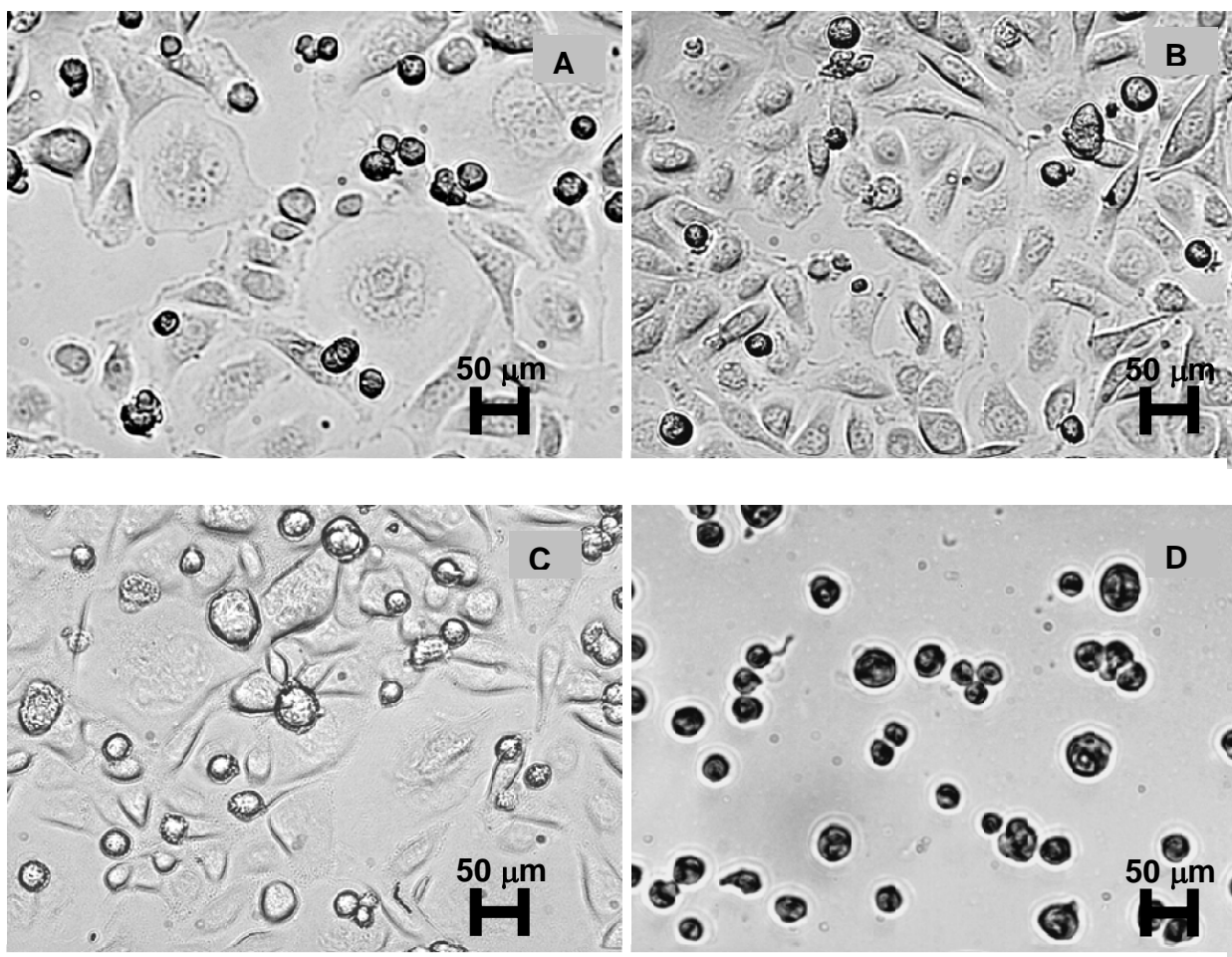
Foi observado que altas concentrações de uleína não favoreceram o aumento na adesão celular, indicando que caso haja ligação da uleína a proteínas receptoras essas apresentam-se saturadas nessas concentrações. É importante relatar que as concentrações de uleína utilizadas variando de  $10^{-5}$  – 100  $\mu\text{g/ml}$  não foram tóxicas para as células B16F10 e RAEC, tal como avaliadas pelo ensaio de exclusão com azul de Trypan, cuja viabilidade celular apresentou-se sempre superior a 94%.

Metástase continua sendo a maior causa de morte em pacientes com câncer. Contudo várias drogas têm sido recomendadas para a terapia e não existem drogas disponíveis os quais podem controlar o processo metastático. A habilidade para interferir com o processo de metástase é, entretanto, de suma importância para a terapia do câncer. Toda combinação padrão para a terapia metastática possui baixa eficiência, baixa razão de resposta e um grande número de efeitos colaterais (Neta, Oppenheim *et al.*, 1988).



Células melanoma B16F10 são linhagens celulares altamente invasivas, portanto possuem alta capacidade de aderência quando comparadas com suas linhagens parentais B16, independente do uso de matriz extracelular, sendo extensivamente utilizadas no estudo metastático *in vivo* e *in vitro* (Murata, Ayukawa *et al.*, 1997).

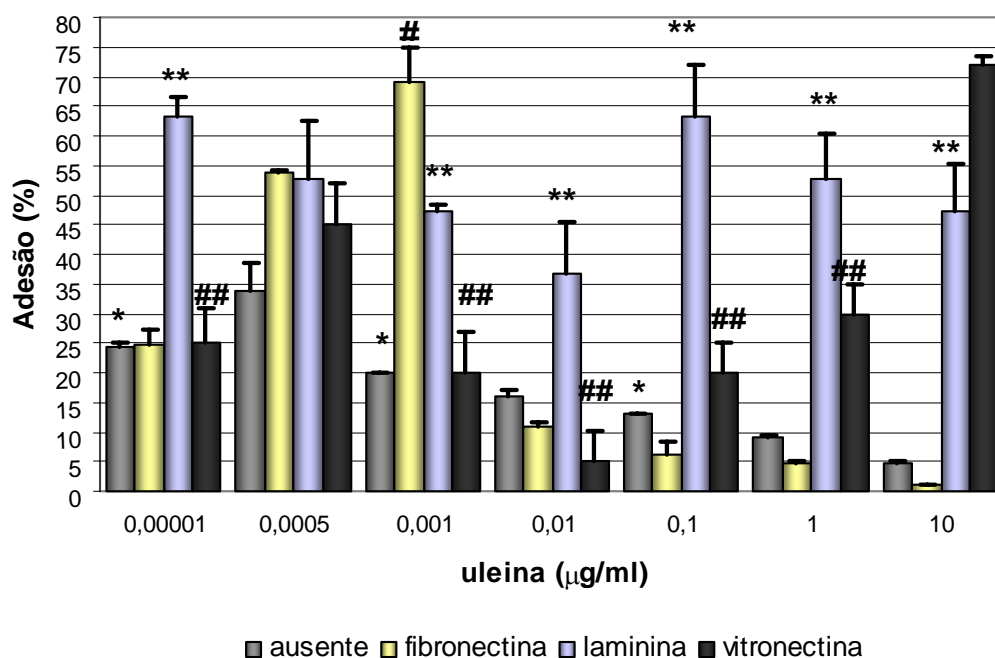
Nossos resultados demonstraram que a uleína é uma substância que aumenta a adesão de células melanoma de camundongos (B16F10) e células endoteliais de aorta de coelho (RAEC) em baixas concentrações de uleína (Figura 26-28). A adesão das células de melanoma nos componentes da matriz extracelular facilita a metástase para tecidos específicos. Wang, Cao *et al.* (2003) demonstraram que o taxol e a camptotecina inibem a adesão de B16F10 para a fibronectina e laminina. Manesh e Kuttan (2005) demonstraram naturalmente a ocorrência de alil e fenil-isotiocianatos na inibição de células melanoma B16F10, promovendo significativa redução na formação de nódulo tumoral no pulmão. Yoshida, Fuchigami *et al.* (2005) informaram que o extrato metanólico das partes aéreas de *Centella asiatica* inibiu *in vitro* o crescimento de adenocarcinoma gástrico humano (MK-1), carcinoma uterino humano (HeLa) e células murino melanoma (B16F10). A uleína na maior concentração testada nesse estudo (100 µg/ml) inibiu a adesão de células em 26,81%, quando comparadas com células B16F10 não tratadas com uleína. Nos resultados obtidos pode-se observar que mesmo as RAEC, uma linhagem não tumoral, têm sua adesão inibida em 12,4% na concentração de 10 µg/ml de uleína, sendo essa inibição aumentada em 68% quando utilizado uma concentração de 100 µg/ml de uleína.



**Figura 28.** Adesão de células melanoma B16F10 induzida pela uleína. As fotomicrografias (100X) mostram a adesão de células B16F10 após serem cultivadas em meio RPMI 1640 (Cultilab) suplementado com soro fetal bovino (SBF 10%), estreptomicina (10 µg/ml) e penicilina (100 U/ml), mantida em atmosfera de 37 °C e 5 a 7% de tensão de CO<sub>2</sub> como controle (A) e em presença de uleína na concentração de 10<sup>-5</sup> µg/ml (B) e 10<sup>-1</sup> µg/ml (C), contrastando com a forma não aderida, esférica, da população tratada com 100 µg/ml de uleína (D).

O estímulo da adesão de células B16F10 pela uleína utilizando a fibronectina, laminina e vitronectina são mostradas na Figura 29. Uleína 5x10<sup>-4</sup> µg/ml demonstrou significativo efeito estimulante (33,89±4,78%) quando comparado ao grupo controle, na ausência de matriz extracelular. Portanto, demonstrou não possuir uma ação competitiva, sendo considerada estimulante reversível da adesão celular para componentes da matriz extracelular, contrariando trabalhos já demonstrados por Yamada e Kennedy (1984) para peptídeos sintéticos. Na presença

de matrizes extracelulares, a adesão máxima ocorreu na concentração de  $10^{-3}$   $\mu\text{g/ml}$  de uleína (69,23 $\pm$ 5,71%) para a fibronectina, 0,1  $\mu\text{g/ml}$  de uleína para a laminina (63,15 $\pm$ 8,81%) e 10  $\mu\text{g/ml}$  de uleína para a vitronectina (72 $\pm$ 1,32%). Nossos resultados demonstraram que o revestimento da placa com laminina aumenta a adesão celular ativada pela uleína, sendo esse efeito mais evidente em altas concentrações utilizadas. Já a adesão sobre a fibronectina é aumentada em baixas concentrações de uleína, sendo que a partir de 0,01  $\mu\text{g/ml}$  essa adesão é inibida. De modo oposto, a vitronectina aumenta a adesão celular somente em altas concentrações de uleína. Esses resultados sugerem que a adesão promovida por uleína pode ser modulada pelas diferentes proteínas de adesão e suas respectivas concentrações. O responsável por mediar essas interações e por qual mecanismo não pode ser esclarecido por esse ensaio.



**Figura 29.** Efeito da atividade aderente da uleína ( $10^{-5}$  – 10  $\mu\text{g/ml}$ ) em células B16F10 para a fibronectina, laminina, vitronectina e na ausência de matriz extracelular\* \*\* # ###  $P \leq 0,05$  em relação ao controle (Holm-Sidak ou Mann-Whitney).

A uleína em concentrações menores estimula a atividade de adesão de B16F10 nas várias matrizes extracelulares utilizadas (fibronectina, laminina e vitronectina), porém em concentrações maiores pode reverter esse processo, como apresentado para a fibronectina, uma importante glicoproteína de membrana. Com esses resultados preliminares, não podemos concluir que a uleína seja um agente quimiopreventivo e que participe na importante regra de modulação de ativação e detoxificação na carcinogênese. O perfil da atividade estimulante específica da uleína estabelece apenas uma capacidade de estimular a adesão *in vitro* para baixas concentrações, o que em tese, contribui para o processo metastático, enquanto que em altas concentrações ocorre diminuição nessa adesão celular, interferindo em uma etapa do complexo processo metastático. Estudos futuros são necessários para verificar a ação da uleína em outras etapas da metástase, como a invasão, migração celular e estudo da angiogênese na tentativa de correlacionar a interferência da uleína na formação do tumor secundário, confirmando assim o uso empírico dessa planta em doenças de natureza tumorais pela população.

## PRODUÇÃO DE ÓXIDO NÍTRICO

O óxido nítrico (NO) é um importante mediador citotóxico de células imunitárias, capaz de destruir patógenos e células tumorais. Possui ainda, um papel como mensageiro/modulador em diversos processos biológicos essenciais. No entanto o NO pode ser potencialmente tóxico dependendo da quantidade produzida (Kuo e Schroeder, 1995). A toxicidade se faz presente particularmente em situações de estresse oxidativo, geração de intermediários do oxigênio e deficiência do sistema antioxidante. Dusse, Vieira *et al.* (2003) citam que o NO possui um papel dúbio, às vezes benéfico, outras vezes prejudicial ao organismo. A determinação laboratorial do NO é complexa, e a caracterização de ativadores e inibidores específicos da síntese de NO

constitui o novo desafio para o entendimento e o tratamento de várias doenças (Matheus, Mantovani *et al.*, 2003).

Entre as atividades farmacológicas detectadas em extrato de plantas, uma das mais frequente é a atividade antiinflamatória. Tal como o óxido nítrico (NO) e as espécies reativas de oxigênio (ROS), conhecidos mediadores liberados no processo inflamatório, a procura por extrato de plantas ou componentes isolados com efeitos antioxidantes e inibitório da produção de NO tem sido largamente estimulado tal como um potencial terapêutico antiinflamatório. A presença de substâncias com atividade antioxidante tem sido também estudadas em plantas com relação estreita entre os radicais livres e o processo de senescência ou neoplásico (Brozmanova, Vlckova *et al.*, 2001; Karbownik, Lewinski *et al.*, 2001). Contudo, algumas vezes, plantas e substâncias que estimulam a produção de NO faz-se necessária em uma série de situações, pois esse medeia vários fenômenos relacionados com cerebelo, nervos não adrenérgicos não colinérgicos (NANC), macrófagos, neutrófilos, rins, células epiteliais pulmonares, mucosa gastrintestinal, miocárdio e vasorelaxamento dependente do endotélio (Gibaldi, 1993; Kiechle e Malinski, 1993; Shapira, Kadar *et al.*, 1994; Barrachina, Panes *et al.*, 2001; Loscalzo, 2001).

A presença de doses crescentes de uleína adicionadas ao cultivo resultou em aumento na produção de NO somente em algumas concentrações. Como pode ser observado nas Figuras 30-31, a produção de NO em células endoteliais (RAEC) mostrou produção máxima na dose de 0,1 µg/ml ( $20,90 \pm 1,41$  µM de nitrito) enquanto para as células B16F10 foi de  $41,19 \pm 0,22$  µM de nitrito na concentração de 1 µg/ml de uleína. A produção de NO dependente de NOS foi testada pela incubação de células RAEC e B16F10 com lipopolissacarídeo bacteriano (LPS, 100 ng/ml), o qual estimulou a produção de óxido nítrico em  $30,8 \pm 1,8$  e  $47,1 \pm 2,0$  µM, respectivamente, e pela inibição da produção com L-NAME em todas as concentrações de uleína utilizadas. Para se ter certeza de que o aumento na produção de NO não era decorrente de morte celular, teste de

viabilidade das células foi realizado após o ensaio e observou-se que em todas as concentrações avaliadas a viabilidade das células sempre foi superior a 94%. As concentrações de 0,01, 10 e 100 µg/ml de uleína não favoreceram a produção de NO em células RAEC, e em células B16F10 não houve produção significativa nas concentrações de 0,01, 0,1, 10 e 100 µg/ml, quando comparadas ao controle contendo células não estimuladas ( $3,79 \pm 0,21$  µM para RAEC e  $2,48 \pm 0,05$  µM para B16F10). Matheus, Mantovani *et al.* (2003) demonstraram que células RAW 264.7 estimuladas com lipopolissacarídeo bacteriano (100 ng/ml) e interferon-alfa (10 U/ml) produziram uma grande quantidade de óxido nítrico (35 µM) quando comparadas com células não estimuladas (3 µM). Fushiya, Kishi *et al.* (1999), com resultados contrários, demonstraram a inibição da síntese de NO em macrófagos utilizando extrato metanólico obtido das partes aéreas de *Cleome droserifolia* e com substâncias isoladas de outras plantas tal como *Lycium chinese* (Kim, Kim *et al.*, 1997) e *Magnolia sieboldii* (Park, Jung *et al.*, 1996). Cho, Nam *et al.* (2001) demonstraram que a siringina, um glicosídeo fenólico isolado de uma variedade de plantas medicinais tais como *Magnolia sieboldii* e *Tinospora cordifolia*, não atenuou a produção de óxido nítrico e viabilidade celular em altas concentrações.

O NO é agente oxidante e pode modular reações inflamatórias e antiinflamatórias dependendo do tipo celular e do estímulo o qual é submetido (Adams, 1996; Cerqueira e Yoshida, 2002). Algumas plantas que apresentam atividade antiinflamatória têm sido reconhecidas pela sua capacidade de inibir produção de NO (Choi e Hwang, 2005) como também pela sua capacidade de estimular a produção de NO (Heo, Lee *et al.*, 2004). Estudos recentes mostraram que a fração rica em alcalóides das cascas de *Himatanthus lancifolius*, dos quais a uleína é o principal constituinte, é capaz de efetuar mudanças na resposta vascular e não vascular da musculatura lisa de aorta de ratos desprovidos de endotélio produzindo relaxamento, e esse evento pode envolver o bloqueio da entrada de cálcio, alterações na mobilização de cálcio

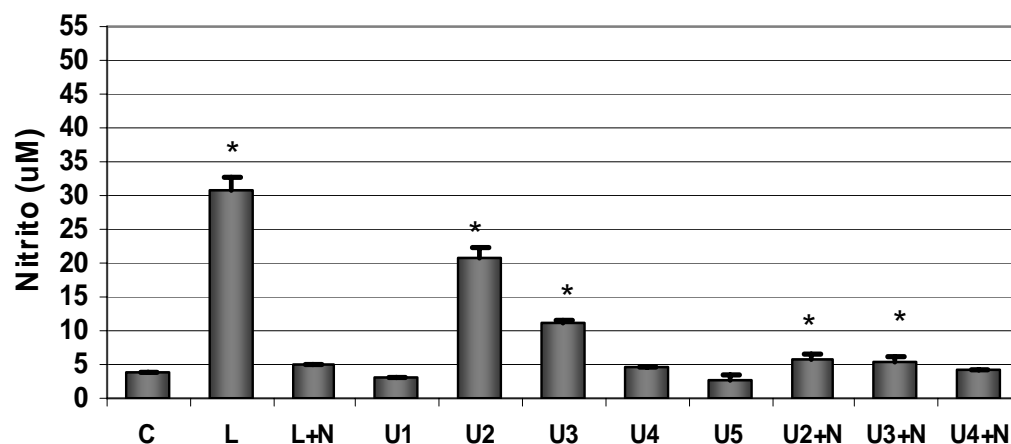
intracelular e também distúrbios na habilidade das células de usar o cálcio para eventos contráteis (Rattmann, Terluk *et al.*, 2005). Os resultados encontrados nesse trabalho, demonstrando que a uleína pode aumentar a produção de NO em determinadas concentrações, descarta a sua ação no bloqueio de cálcio nas células aqui estudadas (RAEC e B16F10), uma vez que a NO sintase é dependente dele (Moncada, Palmer *et al.*, 1991), podendo considerar outros mecanismos já citados por Rattmann, Terluk *et al.*, 2005. Mollace, Salvemini *et al.* (1991) citam que o NO pode ser produzido diretamente pelas células musculares lisas, podendo regular as atividades dessas células por mecanismo dependente da GMPc. O aumento do NO observado nesse trabalho, pode ser devido a ação estimulante direta nas vias de produção de NO nas células RAEC e B16F10 (mouse melanoma cells), e não por ação sequestrante do radical livre, confirmado pelos resultados dos ensaios de atividade antioxidante, o qual demonstraram a baixa atividade da uleína nos dois métodos utilizados (redução do DPPH e redução do ácido fosfomolibdênico), não sendo nesse caso, necessariamente dependente da presença do endotélio. Palmer, Ashton *et al.* (1988) e Wu e Morris (1998) descreveram que várias outras células podem utilizar a L-arginina para sintetizar NO, não somente células endoteliais, comprovadas pelas células tumorais B16F10 aqui estudadas, com produção de óxido nítrico superior ao apresentado pelas células endoteliais na concentração de 1 µg/ml. Choi e Hwang (2005) demonstraram que o NO representa uma via principal tal como agente neurotransmissor, vasodilatador e regulador imunológico em uma variedade de tecidos em concentrações fisiológicas. Segundo Salvemini, Wang *et al.* (1996), o NO é potente vasodilatador e seu envolvimento na resposta inflamatória pode ter relação com sua habilidade em aumentar a permeabilidade vascular e o edema através de mudanças no fluxo sanguíneo local e do aumento na produção de prostaglandinas proinflamatórias.

O aumento da produção de NO pela uleína pode justificar o uso popular da droga agoniada como emenagoga e em distúrbios pós-menopausa devido a atividade relaxante da musculatura lisa pelos alcalóides de *H. lancifolius*. Diversos alcalóides indólicos são conhecidos

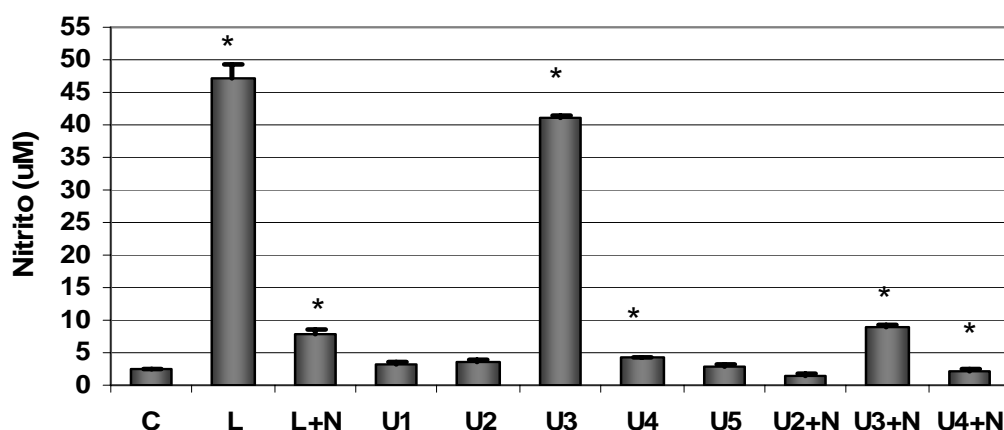
pelas suas atividades vasodilatadoras (Ozaki, 1990; Yuzurihara, Ikarashi *et al.*, 2002) sugerindo que a uleína possa também estar fazendo parte das substâncias que apresentam essa atividade. Corrêa, Batista *et al.* (1998) citam que o uso contínuo da agoniada podem interferir no processo de coagulação, o que leva-nos a sugerir uma provável ação do NO no interior das plaquetas, pois de modo análogo ao discutido para as células musculares lisas endoteliais, o NO promove um aumento de GMPc e consequentemente diminuição de cálcio livre. Como o cálcio livre é essencial para o processo de ativação plaquetária, esse processo será inibido (Wolin, 2000). Para se ter certeza de que o aumento na produção de NO não era decorrente de morte celular, teste de viabilidade das células foi realizado após o ensaio e observou-se que em todas as concentrações avaliadas a viabilidade das células sempre foi superior a 94%.

Embora o NO seja objeto de muitas pesquisas e de grande número de publicações, ainda existem muitas questões controversas e numerosas dúvidas que precisam ser esclarecidas, o que também acontece com esse trabalho, como por exemplo, qual a principal enzima que participa da via de produção de NO que são estimuladas pela uleína.





**Figura 30.** Efeito da uleína (U), lipopolissacarídeo (L) e L-NAME (N) na produção de óxido nítrico em células endoteliais de aorta de coelho (RAEC). Células endoteliais foram tratadas com uleína (U1-0,01; U2-0,1; U3-1; U4-10; U5-100  $\mu\text{g/ml}$ ), lipopolissacarídeo (100  $\text{ng/ml}$ ) e L-NAME (1  $\mu\text{g/ml}$ ), isolados ou em associação. Cada coluna representa a média $\pm$ EPM da quantificação do nitrito medida em espectrofotômetro a 540 nm ( $n=3-5$ ). \* $P\leq 0,05$  em relação ao controle (ANOVA seguido de teste de Holm-Sidak).



**Figura 31.** Efeito da uleína (U), lipopolissacarídeo (L) e L-NAME (N) na produção de óxido nítrico em mouse melanoma cells (B16F10), American Typical Culture Collection (cat # ATCC CRL-6475). Células melanoma foram tratadas com uleína (U1-0,01; U2-0,1; U3-1; U4-10; U5-100  $\mu\text{g/ml}$ ), lipopolissacarídeo (100  $\text{ng/ml}$ ) e L-NAME (1  $\mu\text{g/ml}$ ), isolados e em associação. Cada coluna representa a média $\pm$ EPM da quantificação do nitrito medida em espectrofotômetro a 540 nm ( $n=3-5$ ). \* $P\leq 0,05$  em relação ao controle (ANOVA seguido de teste de Holm-Sidak ou Tukey).

## CONCLUSÕES

---

As principais conclusões obtidas nessa pesquisa foram:

- Isolamento e identificação de três alcalóides indólicos denominados uleína, epiuleína, ioimbina e uma substância caracterizada como sendo a sacarose;
- O isolamento da uleína, principal alcalóide da FAA, contribuiu para confirmar o efeito dessa substância na resposta da musculatura lisa vascular, não vascular e esquelética;
- Doses que variam de 0,25 a 1,5 g/kg de FAA administrada intraperitonealmente teve uma  $DL_{50}$  de 1,3 g/kg e doses de 0,2 a 10,0 g/kg de FAA administrada oralmente teve uma  $DL_{50}$  de 8,9 g/kg. As substâncias isoladas uleína e ioimbina não apresentaram toxicidade aguda quando administrada *i.p* nas doses de (0,1-1 mg/g);
- Uleína não atua como substância quimioatractor e na concentração de  $3,75 \times 10^{-12}$  mol/l demonstrou um efeito inibitório na quimiotaxia leucocitária superior ao efeito apresentado pela dexametasona ( $10^{-5}$  mol/l) utilizada como padrão. O possível mecanismo de ação da uleína na inibição de migração leucocitária está relacionado a ação dessa substância em receptores opióides. A uleína apresentou ausência de citotoxicidade com relação aos leucócitos até a dose de  $3,75 \times 10^{-5}$  mol/l ;
- À medida que aumenta o pH da Fração Alcaloídica da Agoniada (FAA) ocorre uma diminuição da capacidade antioxidante das frações, sendo menores ainda quando se refere às substâncias isoladas devido a uma menor disponibilidade eletrônica capaz de reduzir os padrões do complexo fosfomolibdênico e DPPH utilizados;
- Fração alcaloídica da Agoniada (FAA) e uleína apresentaram atividade antimicrobiana contra vários patógenos gram positivo e gram negativo, inclusive cepas caninas. A uleína

demonstrou ser, em parte, um componente responsável pela atividade antimicrobiana contra o *Staphylococcus aureus* MRSA. Fração apolar não apresentou atividade antimicrobiana;

➤ Concentração de uleína de 1 µg/ml nas células B16F10 e 0,1 µg/ml nas células RAEC produziram 41,19 µM e 20,90 µM, respectivamente de nitrito, estimulando a produção de NO por agir diretamente nas vias de produção e não por um efeito sequestrante dos radicais livres;

➤ Concentração de  $5 \times 10^{-4}$  µg/ml de uleína produziram uma atividade máxima na adesão celular em células B16F10 quando desprovido do uso de matriz. Concentração mais elevada de uleína inibe a adesão de B16F10 somente para a fibronectina, sendo que esse mesmo perfil não é observado para a vitronectina e laminina, o que leva-nos a hipotetizar que altas concentrações de uleína podem inibir a adesão de células tumorais da linhagem B16, porém sem causar morte celular.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

---

- Abe, F., R. F. Chen, *et al.* *Chem. Pharm. Bull.*, v.36, p.2784. 1988.
- Abisch, E. e T. Reichsteris. Oruebtuerebde Chemische Untersuchung einiger Apocynaceen. *Helv. Chim. Acta*, v.53, p.1844-1861. 1960.
- Acco, A., M. R. Terluk, *et al.* Fração gordurosa da agoniada (*Plumeria lancifolia*): Estudo da possível atividade estrogênica. *XIV Simpósio de Plantas Medicinais do Brasil*. Florianópolis, Brasil: Anais do XIV Simpósio de Plantas Medicinais do Brasil 1996.
- Adam, G., N. H. Khoi, *et al.* Plant growth inhibiting properties of plumieride from *Plumeria obtusifolia*. *Phytochemistry*, v.18, p.1399-1400. 1979.
- Adams, G. A. e R. Young. Capsular polysaccharides of *Serratia marcescens*. *Can J Biochem Physiol*, v.43, n.9, Sep, p.1499-512. 1965.
- Adams, H. R. Physiologic, pathophysiologic, and therapeutic implications for endogenous nitric oxide. *J Am Vet Med Assoc*, v.209, n.7, Oct 1, p.1297-302. 1996.
- Agarwal, O. P. The anti-inflammatory action of nepitrin, a flavonoid. *Agents Actions*, v.12, n.3, Jul, p.298-302. 1982.
- Akhtar, N. e A. Malik. Oleanene type triterpenes from *Plumeria rubra*. *Phytochemistry*, v.32, n.6, July 1992, p.1523-1525. 1993.
- Albers-Sconberg, G. e H. Schmid. *Helvetica Chimica Acta*, v.44, p.1447. 1961.
- Alberts, B., D. Bray, *et al.* *Molecular Biology of the Cell*. New York. 1994
- Altman, L. C., J. S. Hill, *et al.* Effects of corticosteroids on eosinophil chemotaxis and adherence. *J Clin Invest*, v.67, n.1, Jan, p.28-36. 1981.
- Archer, S. Measurement of nitric oxide in biological models. *Faseb J*, v.7, n.2, Feb 1, p.349-60. 1993.
- Aynilian, G. H. e N. R. Farnsworth. Alkaloids of *Vinca* species. 3. Isolation and characterization of indole alkaloids from *Vinca libanotica*. *Lloydia*, v.37, n.2, Jun, p.299-308. 1974.
- Azambuja, M. Z. B., P. Campelo, *et al.* Arquivos do serviço florestal. v.3, n.13, p.23-24, 41-42, 44-45. 1994.
- Baggio, C. H., G. De Martini Otofuiji, *et al.* Gastroprotective mechanisms of indole alkaloids from *Himatanthus lancifolius*. *Planta Med*, v.71, n.8, Aug, p.733-8. 2005.

- Baggiolini, M. e B. Moser. Blocking chemokine receptors. *J Exp Med*, v.186, n.8, Oct 20, p.1189-91. 1997.
- Baker, A. K. e T. F. Meert. Functional effects of systemically administered agonists and antagonists of mu, delta, and kappa opioid receptor subtypes on body temperature in mice. *J Pharmacol Exp Ther*, v.302, n.3, Sep, p.1253-64. 2002.
- Barrachina, M. D., J. Panes, *et al.* Role of nitric oxide in gastrointestinal inflammatory and ulcerative diseases: perspective for drugs development. *Curr Pharm Des*, v.7, n.1, Jan, p.31-48. 2001.
- Barreto, A. S. C., M.G.; Nery, I.A.; Gonzaga, L.; Kaplan, M.A.C. Chemical constituents from *H. articulata*. *J. Braz. Chem. Soc*, v.9, p.430-434. 1998.
- Basile, A., S. Sorbo, *et al.* Antibacterial and allelopathic activity of extract from *Castanea sativa* leaves. *Fitoterapia*, v.71 Suppl 1, Aug, p.S110-6. 2000.
- Beckman, J. S. e W. H. Koppenol. Nitric oxide, superoxide, and peroxynitrite: the good, the bad, and ugly. *Am J Physiol*, v.271, n.5 Pt 1, Nov, p.C1424-37. 1996.
- Berghe, D. A. V. P., M. Leven, *et al.* *Journal Natural of Products*, v.5, p.463-471. 1978.
- Bokoch, G. M. Chemoattractant signaling and leukocyte activation. *Blood*, v.86, n.5, Sep 1, p.1649-60. 1995.
- Borris, R. P., D. C. Lankin, *et al.* Studies on the uleine alkaloids I. Carbon-13 RNM studies on uleine, 20-epi-uleine and (4,S)-uleine-Nb-oxide. *Journal Natural of Products*, v.46, p.200-205. 1983.
- Boyden, S. The chemotactic effect of mixtures of antibody and antigen on polymorphonuclear leucocytes. *J Exp Med*, v.115, Mar 1, p.453-66. 1962.
- Bramadhyalaselvam, A. e A. Jaffer Hussain. <sup>13</sup>C-RNM assignments of iridois from *Plumeria alba*. *Fitoterapia*, v.68, p.554-555. 1997.
- Brantl, V., H. Teschemacher, *et al.* Opioid activities of beta-casomorphins. *Life Sci*, v.28, n.17, Apr 27, p.1903-9. 1981.
- Bredt, D. S. e S. H. Snyder. Nitric oxide mediates glutamate-linked enhancement of cGMP levels in the cerebellum. *Proc Natl Acad Sci U S A*, v.86, n.22, Nov, p.9030-3. 1989.
- Breimaier, E. *Structure Elucidation by RNM in Organic Chemistry*. New York: John Wiley & Sons. 1993. 265 p.
- Brozmanova, J., V. Vlckova, *et al.* Increased DNA double strand breakage is responsible for sensitivity of the pso3-1 mutant of *Saccharomyces cerevisiae* to hydrogen peroxide. *Mutat Res*, v.485, n.4, May 10, p.345-55. 2001.

- Buchi, G. e E. W. Warnhoff. The structure of uleine. *Journal American Chemical Society*, v.81, p.4433-4434. 1959.
- Budzikiewicz, H., C. Djerassi, *et al.* *Structure elucidation of natural products by mass spectrometry*. San Francisco: Holden Day, v.1. 1964. 233 p.
- Burkill, I. H. *A Dictionary of the Economic Products of the Malay Peninsula*, Malaysia: Ministry of Agriculture and Co-operatives, v.2. 1966. 1808 p.
- Caetano, N. N., M. R. Duarte, *et al.* *Farmacognosia prática*: Universidade Federal do Paraná: 90 p. 1996.
- Carr, D. J., C. H. Kim, *et al.* Evidence for a delta-class opioid receptor on cells of the immune system. *Cell Immunol*, v.116, n.1, Oct 1, p.44-51. 1988.
- Cassatella, M. A. The production of cytokines by polymorphonuclear neutrophils. *Immunol Today*, v.16, n.1, Jan, p.21-6. 1995.
- Cassatella, M. A., F. Bazzoni, *et al.* IL-8 production by human polymorphonuclear leukocytes. The chemoattractant formyl-methionyl-leucyl-phenylalanine induces the gene expression and release of IL-8 through a pertussis toxin-sensitive pathway. *J Immunol*, v.148, n.10, May 15, p.3216-20. 1992.
- Cerqueira, N. F. e W. B. Yoshida. Óxido Nítrico: Revisão. *Acta Cirurgica Brasileira*, v.17, p.417-423. 2002.
- Cho, J. Y., K. H. Nam, *et al.* In-vitro and in-vivo immunomodulatory effects of syringin. *J Pharm Pharmacol*, v.53, n.9, Sep, p.1287-94. 2001.
- Choi, E. M. e J. K. Hwang. Effects of *Morus alba* leaf extract on the production of nitric oxide, prostaglandin E2 and cytokines in RAW264.7 macrophages. *Fitoterapia*, v.76, n.7-8, Dec, p.608-13. 2005.
- Clark, R. A., J. I. Gallin, *et al.* Effects of in vivo prednisone on *in vitro* eosinophil and neutrophil adherence and chemotaxis. *Blood*, v.53, n.4, Apr, p.633-41. 1979.
- Coimbra, R. *Manual de fitoterapia*. Belém: CESUP, v.1. 1994
- Colowick, S. P. e N. O. Kaplan. *Immunochemical Techniques: Chemotaxis and inflammation. Methods in Enzymology*. San Diego: Academic Press Inc. 1999. 327 p.
- Coppen, J. W. e A. L. Cobb. The occurrence of iridoids in *Plumeria* and *Allamanda*. *Phytochemistry*, n.22, p.128-128. 1983.
- Coppen, J. W. e L. A. Cobb. *Phytochemistry*, v.22, p.125. 1983.
- Cordell, G. A. *Introduction to alkaloids: A biogenetic approach*, New York: John Wiley & Sons, v.1. 1981. 1055 p.

- Corrêa, A., R. Batista, *et al.* *Do cultivo a Terapêutica. Plantas medicinais*, Petrópolis: Vozes. 1998. p.65 p.
- Correa, M. P. *Dicionário das plantas úteis do Brasil e das exóticas cultivadas*. Rio de Janeiro: Imprensa Nacional, v.1. 1984
- Costa, A. F. *Farmacognosia*, Lisboa: Fundação Calouste Gulbenkian, v.1. 1968
- Cronquist, A. *The evolution and classification of flowering plants*, New York: The New York Botanical Garden. 1988
- Cuellar, A. e H. O'Farril. *Rev. Cub. Farm*, v.10, p.25-30. 1976.
- Dacie, J. D. e S. M. Lewis. *Practical Hematology*. Edinburgh: Churchill Livingstone, v.1. 1995
- Davies, M. G. e P. O. Hagen. Systemic inflammatory response syndrome. *Br J Surg*, v.84, n.7, Jul, p.920-35. 1997.
- De Bruyn, A. e J. Van Loo. The identification by <sup>1</sup>H- and <sup>13</sup>C-n.m.r. spectroscopy of sucrose, 1-kestose, and neokestose in mixtures present in plant extracts. *Carbohydr Res*, v.211, n.1, Apr 2, p.131-6. 1991.
- De Miranda, A. L., J. R. Silva, *et al.* Anti-inflammatory and analgesic activities of the latex containing triterpenes from *Himatanthus sucuuba*. *Planta Med*, v.66, n.3, Apr, p.284-6. 2000.
- Dekker, L. V. e A. W. Segal. Perspectives: signal transduction. Signals to move cells. *Science*, v.287, n.5455, Feb 11, p.982-3, 985. 2000.
- Deng, Y., J. P. Lee, *et al.* New antimicrobial flavanones from *Physena madagascariensis*. *J Nat Prod*, v.63, n.8, Aug, p.1082-9. 2000.
- Dewick, P. M. *Medicinal Natural Products. A Biosynthetic Approach*. England: John Wiley & Sons LTD, v.1. 2002. 515 p.
- Di Stasi, L. C. e C. A. Hiruma Lima. *Plantas medicinais na Amazônia e na mata Atlântica*. São Paulo: Unesp. 2002
- Dudez, T. S., M. Chanson, *et al.* Characterization of a novel chemotactic factor for neutrophils in the bronchial secretions of patients with cystic fibrosis. *J Infect Dis*, v.186, n.6, Sep 15, p.774-81. 2002.
- Dusse, L. M. S., L. M. Vieira, *et al.* Revisão sobre óxido nítrico. *Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial*, v.39, n.4, p. 343-350. 2003.
- Dusting, G. J. e P. S. Macdonald. Endogenous nitric oxide in cardiovascular disease and transplantation. *Ann Med*, v.27, n.3, p.395-406. 1995.

- Endo, Y., H. Hayashi, *et al.* Confluent acid and 2'-O-methylperlatolic acid, monoamine oxidase B inhibitors in a Brazilian plant, *Himatanthus sucuuba*. *Chem Pharm Bull (Tokyo)*, v.42, n.6, p.1198-201. 1994.
- Evans, W. *Trease and Evans`Pharmacognosy*. London: Saunders Company Limited. 1996
- Fernandes, M. Z. L. C. M., R. M. Fernandes, *et al.* Determinação da toxicidade aguda da *Himatanthus sucuuba* (Spruce) Woodson (Apocynaceae) em camundongos. *Revista Brasileira de Farmacia*, v.81, p.98-100. 2000.
- Ferrendelli, J. A., M. M. Chang, *et al.* Elevation of cyclic GMP levels in central nervous system by excitatory and inhibitory amino acids. *J Neurochem*, v.22, n.4, p.535-40. 1974.
- Ferrigni, V., R. Nelson, *et al.* *Rev. Latinoamer. Quim.*, v.7, p.146. 1976.
- Fiat, A. M., D. Migliore-Samour, *et al.* Biological active peptides from milk proteins with emphasis on two examples concerning antithrombotic and immunomodulating activities. *J. Dairy Sci*, v.76, p.301-310. 1991.
- Fidler, I. J. e I. R. Hart. Biological diversity in metastatic neoplasms: origins and implications. *Science*, v.217, n.4564, Sep 10, p.998-1003. 1982.
- Finau, J., M. Anguinoni, *et al.* Ação antiulcerogênica da fração alcaloídica da *Plumeria lancifolia* (Agoniada). XIV Reunião anual da Federação. Caxambu-Brasil, 1996. p.
- Florey, H. W. *Antibiotics*. New York: Oxford University Press, v.1. 1949. 576 p.
- Franca, O. O., R. T. Brown, *et al.* Uleine and demethoxyaspidospermine from the bark of *Plumeria lancifolia*. *Fitoterapia*, v.71, n.2, Apr, p.208-10. 2000.
- Frear, D. E. H. A catalogue of insecticides and fungicides. *Chronica Botanica Company*, v.II, p.87. 1948.
- Furchgott, R. F. e J. V. Zawadzki. The obligatory role of endothelial cells in the relaxation of arterial smooth muscle by acetylcholine. *Nature*, v.288, n.5789, Nov 27, p.373-6. 1980.
- Fushiya, S., Y. Kishi, *et al.* Flavonoids from *Cleome droserifolia* suppress NO production in activated macrophages *in vitro*. *Planta Med*, v.65, n.5, Jun, p.404-7. 1999.
- Gaskell, J. e J. A. Joule. The structure of uleine - relative stereochemistry. *Chem. Ind.*, v.23, p.1089-1090. 1967.
- Gattegno, L., D. Migliore-Samour, *et al.* Enhancement of phagocytic activity of human monocytic-macrophagic cells by immunostimulating peptides from human casein. *Immunol Lett*, v.18, n.1, May, p.27-31. 1988.
- Gewaltig, M. T. e G. Kojda. Vasoprotection by nitric oxide: mechanisms and therapeutic potential. *Cardiovasc Res*, v.55, n.2, Aug 1, p.250-60. 2002.



- Gibaldi, M. What is nitric oxide and why are so many people studying it? *J Clin Pharmacol*, v.33, n.6, Jun, p.488-96. 1993.
- Githens, T. S. *Drug Plants of Africa*, Philadelphia: University of Pennsylvania Press. 1949. 100 p.
- Green, L. C., D. A. Wagner, *et al.* Analysis of nitrate, nitrite, and [15N]nitrate in biological fluids. *Anal Biochem*, v.126, n.1, Oct, p.131-8. 1982.
- Grimm, M. C., A. Ben-Baruch, *et al.* Opiate inhibition of chemokine-induced chemotaxis. *Ann N Y Acad Sci*, v.840, May 1, p.9-20. 1998.
- Gryglewski, R. J., R. M. Palmer, *et al.* Superoxide anion is involved in the breakdown of endothelium-derived vascular relaxing factor. *Nature*, v.320, n.6061, Apr 3-9, p.454-6. 1986.
- Guerra, M. O. e V. M. Peters. Screening for reproductive toxicity in rats for a decoction of *Himathanthus sucuuba* stem bark. *J Ethnopharmacol*, v.34, n.2-3, Sep, p.195-9. 1991.
- Guimarães, B.C. e L.T. Nascimento. *Análise de complexidade de métodos numéricos para interpolação*. Disponível em: < <http://www.homepages.dcc.ufmg/~nivio/cursos/pa02/seminários/seminário6/seminário06.html> > Acesso em: 29 de março de 2007.
- Hallett, M. B., E. V. Davies, *et al.* Oxidase activation in individual neutrophils is dependent on the onset and magnitude of the Ca<sup>2+</sup> signal. *Cell Calcium*, v.11, n.10, Nov-Dec, p.655-63. 1990.
- Haston, W. S. e P. C. Wilkinson. Locomotion and chemotaxis of leukocytes: gradient perception and locomotor capacity. *Curr Opin Immunol*, v.1, n.1, Sep-Oct, p.5-9. 1988.
- Henriques, A. T., V. A. Kerber, *et al.* *Alcalóides: generalidades e aspectos básicos*, Porto Alegre/Florianópolis.: Editora da Universidade UFRGS/Editora da UFSC. 1999
- Heo, K. S., S. J. Lee, *et al.* Glycoprotein isolated from *Solanum nigrum* L. inhibits the DNA-binding activities of NF-kappaB and AP-1, and increases the production of nitric oxide in TPA-stimulated MCF-7 cells. *Toxicol in vitro*, v.18, n.6, Dec, p.755-63. 2004.
- Hofbauer, R., M. Frass, *et al.* The green tea extract epigallocatechin gallate is able to reduce neutrophil transmigration through monolayers of endothelial cells. *Wien Klin Wochenschr*, v.111, n.7, Apr 9, p.278-82. 1999.
- Hofbauer, R., M. Frass, *et al.* Effects of garlic extract (*Allium sativum*) on neutrophil migration at the cellular level. *Heart Dis*, v.3, n.1, Jan-Feb, p.14-7. 2001.
- Ignarro, L. J. Biosynthesis and metabolism of endothelium-derived nitric oxide. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*, v.30, p.535-60. 1990.
- Ignarro, L. J., R. E. Byrns, *et al.* Endothelium-derived relaxing factor from pulmonary artery and vein possesses pharmacologic and chemical properties identical to those of nitric oxide radical. *Circ Res*, v.61, n.6, Dec, p.866-79. 1987.

- Ihantola-Vormisto, A., J. Summanen, *et al.* Anti-inflammatory activity of extracts from leaves of *Phyllanthus emblica*. *Planta Med*, v.63, n.6, Dec, p.518-24. 1997.
- Ilson, D. H. New developments in the treatment of esophageal cancer. *Curr Oncol Rep*, v.4, n.3, May, p.213-21. 2002.
- Jacome, R. L. R. P. e A. B. Oliveira. Estudo quimico e perfil cromatográfico das cascas de *Aspidosperma parvifolium* A.DC. (pau pereira). *Quim. Nova*, v.27, n.6, p.897-900. 2004.
- James, S. L. Role of nitric oxide in parasitic infections. *Microbiol Rev*, v.59, n.4, Dec, p.533-47. 1995.
- Jasztold-Howorko, R., A. Croisy, *et al.* Synthesis, structure, and cytostatic properties of new olivacine derivatives. *Arch Pharm (Weinheim)*, v.337, n.11, Nov, p.599-604. 2004.
- Joly, A. B. *Botânica: Introdução à taxonomia vegetal*. São Paulo: Nacional. 1998
- Joule, J. A. e C. Djerassi. Alkaloids studies XLIV. Mass spectrometry in structural and stereochemical problems. XLII. Some aspects of the chemistry and mass spectrometry of uleine. *J. Am. Chem. Soc.*, p.2777-2789. 1964.
- Karbownik, M., A. Lewinski, *et al.* Anticarcinogenic actions of melatonin which involve antioxidative processes: comparison with other antioxidants. *Int J Biochem Cell Biol*, v.33, n.8, Aug, p.735-53. 2001.
- Kardono, B. S., S. Tsauri, *et al.* A Flavan-3-ol glycoside from bark of *Plumeria rubra*. *Phytochemistry*, v.29, n.9, 16 january 1990, p.2995-2997. 1990.
- Kardono, L. B., S. Tsauri, *et al.* Cytotoxic constituents of the bark of *Plumeria rubra* collected in Indonesia. *J Nat Prod*, v.53, n.6, Nov-Dec, p.1447-55. 1990.
- Kazmi, S. N. U. H. *Heterocycles*, v.29, n.10, p.1901-1906. 1989.
- Kiechle, F. L. e T. Malinski. Nitric oxide. Biochemistry, pathophysiology, and detection. *Am J Clin Pathol*, v.100, n.5, Nov, p.567-75. 1993.
- Kim, H. P., S. Y. Kim, *et al.* Zeaxanthin dipalmitate from *Lycium chinense* has hepatoprotective activity. *Res Commun Mol Pathol Pharmacol*, v.97, n.3, Sep, p.301-14. 1997.
- Kirtikar, K. R. e B. D. Basu. *Indian Medicinal Plants*\_\_\_. Dehra Dun: International Book Distributors  
v.2. 1935. 1548 p.
- Kisakurek, M. V. e M. Hesse. *Chemotaxonomic Studies of the Apocynaceae*. London: Academic Press. 1980
- Kisakurek, M. V., A. J. M. Leewenberg, *et al.* *Alkaloids: Chemical and Biological Perspective*. New York: John Wiley and Sons. 1983. p17 p.

- Kubes, P., M. Suzuki, *et al.* Nitric oxide: an endogenous modulator of leukocyte adhesion. *Proc Natl Acad Sci U S A*, v.88, n.11, Jun 1, p.4651-5. 1991.
- Kuo, P. C. e R. A. Schroeder. The emerging multifaceted roles of nitric oxide. *Ann Surg*, v.221, n.3, Mar, p.220-35. 1995.
- Larrauri, J. A., I. Goni, *et al.* Measurement of health promoting properties in fruit dietary fibres: Antioxidant capacity, fermentability and glucose retardation index. *Journal of the sciences of food and Agriculture*, v.71, p.515-519. 1996.
- Le Men, L. e W. I. Taylor. A uniform numbering system for indole alkaloids. *Experientia*, v.21, n.9, Sep 15, p.508-10. 1965.
- Lee, G. R. e J. Foerster. *Wintrobe's clinical hematology*. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins. 1999
- Leek, R. D. The prognostic role of angiogenesis in breast cancer. *Anticancer Res*, v.21, n.6B, Nov-Dec, p.4325-31. 2001.
- Le Verge, R., P. Le Corre, *et al.* Determination of yohimbine and its two hydroxylated metabolites in humans by high-performance liquid chromatography and mass spectral analysis. *J Chromatogr*, v.574, n.2, Feb 14, p.283-92. 1992.
- Lewis, S. L. e D. E. Van Epps. Demonstration of specific receptors for fluoresceinated casein on human neutrophils and monocytes using flow cytometry. *Inflammation*, v.7, n.4, Dec, p.363-75. 1983.
- Liang, Y. S., Y. H. Choi, *et al.* Metabolomic analysis of methyl jasmonate treated Brassica rapa leaves by 2-dimensional RNM spectroscopy. *Phytochemistry*, v.67, n.22, Nov, p.2503-11. 2006.
- Lima, V. B., R. M. Braga, *et al.* *Estudo Fitoquímico de Himatanthus obovatus*. Sociedade Brasileira de Química. Livro de Resumos. Poços de Caldas: Resumo, 1999. PN-121 p.
- Liotta, L. A., C. N. Rao, *et al.* Tumor invasion and the extracellular matrix. *Lab Invest*, v.49, n.6, Dec, p.636-49. 1983.
- Little, J. E. e D. B. Johnstone. Plumericin: an Antimicrobial Agent from *Plumeria multiflora*. Vermont Agricultural Experiment Station. *Journal Series Paper n° 10*. 1950.
- Liu, Y., D. J. Blackburn, *et al.* Effects of *in vivo* and *in vitro* administration of morphine sulfate upon rhesus macaque polymorphonuclear cell phagocytosis and chemotaxis. *J Pharmacol Exp Ther*, v.263, n.2, Nov, p.533-9. 1992.
- Lomas, D. A., M. *et al.* The effect of *in vitro* and *in vivo* dexamethasone on human neutrophil function. *Agents Actions*, v.33, n.3-4, Jul, p.279-85. 1991.
- Lopes, J.F. Andamento de dissertação de Mestrado. Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas, Universidade Federal do Paraná, 2007.

- Loscalzo, J. Nitric oxide insufficiency, platelet activation, and arterial thrombosis. *Circ Res*, v.88, n.8, Apr 27, p.756-62. 2001.
- Luna, L. E. The concept of plants as teachers among four mestizo shamans of Iquitos, northeastern Peru. *J Ethnopharmacol*, v.11, n.2, Jul, p.135-56. 1984.
- Lyons, C. R. The role of nitric oxide in inflammation. *Adv Immunol*, v.60, p.323-71. 1995.
- Makman, M. H., T. V. Bilfinger, *et al.* Human granulocytes contain an opiate alkaloid-selective receptor mediating inhibition of cytokine-induced activation and chemotaxis. *J Immunol*, v.154, n.3, Feb 1, p.1323-30. 1995.
- Manesh, C. e G. Kuttan. Effect of naturally occurring isothiocyanates in the inhibition of cyclophosphamide-induced urotoxicity. *Phytomedicine*, v.12, n.6-7, Jun, p.487-93. 2005.
- Mann, J. *Secondary metabolism*. Oxford: Clarendon. 1987
- Manske, R. H. F. e R. Rodrigo. *The alkaloids*. New York: Academic press, v.8. 1965
- Marcoli, M., G. Ricevuti, *et al.* Opioid-induced modification of granulocyte function. *Int J Immunopharmacol*, v.10, n.4, p.425-33. 1988.
- Marletta, M. A. Nitric oxide synthase: aspects concerning structure and catalysis. *Cell*, v.78, n.6, Sep 23, p.927-30. 1994.
- Massiot, G., A. Boumendel, *et al.* Alkaloids from *Alstonia undulifolia*. *Phytochemistry*, v.31, n.3, p.1078-1079. 1992.
- Matheus, M. E., I. S. B. Mantovani, *et al.* Ação de extratos de Açaí (*Euterpe oleraceae* Maet.) sobre a produção de óxido nítrico em células RAW 264.7. *Revista Brasileira de Farmacognosia*, v.13, n.supl., p.03-05. 2003.
- Mckinnell, I. Local research ethics committees. *J R Coll Physicians Lond*, v.32, n.3, May-Jun, p.274-5. 1998.
- Melo, E.A. *Arvores do Brasil*. Disponível em:< <http://www.arvores.brasil.com.br/florin/agonia.htm>> Acesso em: 29 de março de 2007.
- Mensor, L. L., F. S. Menezes, *et al.* Screening of Brazilian plant extracts for antioxidant activity by the use of DPPH free radical method. *Phytother Res*, v.15, n.2, Mar, p.127-30. 2001.
- Merchant, D. e R. Kahn. *Handbook of Cell and Organ Culture*. Broken Arrow: Burgess Publishing. 1964
- Miki, N., Y. Kawabe, *et al.* Activation of cerebral guanylate cyclase by nitric oxide. *Biochem Biophys Res Commun*, v.75, n.4, Apr 25, p.851-6. 1977.

Mollace, V., D. Salvemini, *et al.* Nitric oxide from vascular smooth muscle cells: regulation of platelet reactivity and smooth muscle cell guanylate cyclase. *Br J Pharmacol*, v.104, n.3, Nov, p.633-8. 1991.

Moncada, S., R. M. Palmer, *et al.* Nitric oxide: physiology, pathophysiology, and pharmacology. *Pharmacol Rev*, v.43, n.2, Jun, p.109-42. 1991.

Moncada, S., M. W. Radomski, *et al.* Endothelium-derived relaxing factor. Identification as nitric oxide and role in the control of vascular tone and platelet function. *Biochem Pharmacol*, v.37, n.13, Jul 1, p.2495-501. 1988.

Morris, S. M., Jr. e T. R. Billiar. New insights into the regulation of inducible nitric oxide synthesis. *Am J Physiol*, v.266, n.6 Pt 1, Jun, p.E829-39. 1994.

Moura, R. A. *Técnicas de laboratórios*. Rio de Janeiro: Atheneu. 1987

Muller, A. A., S. A. Reiter, *et al.* Plant-derived acetophenones with antiasthmatic and anti-inflammatory properties: inhibitory effects on chemotaxis, right angle light scatter and actin polymerization of polymorphonuclear granulocytes. *Planta Med*, v.65, n.7, Oct, p.590-4. 1999.

Murata, J., K. Ayukawa, *et al.* Alpha-melanocyte-stimulating hormone blocks invasion of reconstituted basement membrane (Matrigel) by murine B16 melanoma cells. *Invasion Metastasis*, v.17, n.2, p.82-93. 1997.

Nathan, C. Nitric oxide as a secretory product of mammalian cells. *Faseb J*, v.6, n.12, Sep, p.3051-64. 1992.

Nava, E. e T. F. Luscher. Endothelium-derived vasoactive factors in hypertension: nitric oxide and endothelin. *J Hypertens Suppl*, v.13, n.2, Aug, p.S39-48. 1995.

Neta, R., J. J. Oppenheim, *et al.* Interdependence of the radioprotective effects of human recombinant interleukin 1 alpha, tumor necrosis factor alpha, granulocyte colony-stimulating factor, and murine recombinant granulocyte-macrophage colony-stimulating factor. *J Immunol*, v.140, n.1, Jan 1, p.108-11. 1988.

Neto, C. C., C. W. Owens, *et al.* Antibacterial activity of some Peruvian medicinal plants from the Callejon de Huaylas. *J Ethnopharmacol*, v.79, n.1, Jan, p.133-8. 2002.

Nicolson, G. L. Cancer metastasis. Organ colonization and the cell-surface properties of malignant cells. *Biochim Biophys Acta*, v.695, n.2, Dec 21, p.113-76. 1982.

Ohashi, M., J. A. Joule, *et al.* The structures of five new Aspidosperma alkaloids related to uleine. *Experientia*, v.20, n.7, Jul 15, p.363-4. 1964.

Oliveira, F. e G. Akisue. *Fundamentos de farmacobotânica*. São Paulo: Atheneu. 1987. 221 p.

Osborne, E. M. *Brit. J. Exph. Path.*, v.24, p.227. 1943.

- Ozaki, Y. [Vasodilative effects of indole alkaloids obtained from domestic plants, *Uncaria rhynchophylla* Miq. and *Amsonia elliptica* Roem. et Schult]. *Nippon Yakurigaku Zasshi*, v.95, n.2, Feb, p.47-54. 1990.
- Palmer, R. M., D. S. Ashton, *et al.* Vascular endothelial cells synthesize nitric oxide from L-arginine. *Nature*, v.333, n.6174, Jun 16, p.664-6. 1988.
- Palmer, R. M., A. G. Ferrige, *et al.* Nitric oxide release accounts for the biological activity of endothelium-derived relaxing factor. *Nature*, v.327, n.6122, Jun 11-17, p.524-6. 1987.
- Park, H. J., W. T. Jung, *et al.* Syringin 4-O-beta-glucoside, a new phenylpropanoid glycoside, and costunolide, a nitric oxide synthase inhibitor, from the stem bark of *Magnolia sieboldii*. *J Nat Prod*, v.59, n.12, Dec, p.1128-30. 1996.
- Pasotti, D., A. Mazzone, *et al.* [The nervous system and the immune system: the role of morphine and opioid peptides in the function of neutrophilic granulocytes]. *Minerva Med*, v.83, n.7-8, Jul-Aug, p.433-8. 1992.
- Peckolt, T. *Arch Pharm (Weinheim)*, v.142, p.40. 1870.
- Pelah, Z., M. A. Kielczewski, *et al.* Mass spectrometry in Structural and Stereochemical problems. XXVII. Mass spectral fragmentation processes and Hydrogen transfer Reactions of Amides and Amines. *Journal American Chemical Society*, v.85, p.2470-2481. 1963.
- Perdue, G. P. e R. N. Blomster. South American plants III: Isolation of fulvoplumierin from *Himatanthus sucuuba* (M. Arg.) Woodson (Apocynaceae). *J Pharm Sci*, v.67, n.9, Sep, p.1322-3. 1978.
- Perretti, M. e R. J. Flower. Modulation of IL-1-induced neutrophil migration by dexamethasone and lipocortin 1. *J Immunol*, v.150, n.3, Feb 1, p.992-9. 1993.
- Perrin, D. D., W. L. F. Amarego, *et al.* *Purification of Laboratory Chemicals*. Oxford: Pergamon Press. 1966
- Perry, L. M. e J. Metzger. *Medicinal plants of east and south Asia*. Cambridge, England: the MIT Press, v.29. 1980
- Persinos, G. e R. Blomster. *J. Pharm. Sci*, v.67, p.1322. 1978.
- Plumel, M. *The Genus Himatanthus Apocynaceae Taxonomic Revision.*: Bradea 5. 1991
- Presibella, M. M., C. A. M. Santos, *et al.* Influência de extratos hidroetanólicos de plantas medicinais sobre a quimiotaxia de leucócitos humanos. *Revista Brasileira de Farmacognosia*, v.13, n.2, 28/11/2003, p.75-82. 2003.
- Prieto, P., M. Pineda, *et al.* Spectrophotometric quantitation of antioxidant capacity through the formation of a phosphomolybdenum complex: specific application to the determination of vitamin E. *Anal Biochem*, v.269, n.2, May 1, p.337-41. 1999.

- Radford, D. J., A. D. Gillies, *et al.* Naturally occurring cardiac glycosides. *Med J Aust*, v.144, n.10, May 12, p.540-4. 1986.
- Radomski, M. W., R. M. Palmer, *et al.* Comparative pharmacology of endothelium-derived relaxing factor, nitric oxide and prostacyclin in platelets. *Br J Pharmacol*, v.92, n.1, Sep, p.181-7. 1987.
- Radomski, K. Palmer, R.M.J. Moncada, S. An L-arginine/nitric oxide pathway present in human platelets regulates aggregation. *Proc Natl Acad Sci U S A*, v.87, n.13, Jul, p.5193-7. 1990.
- Rang, H., M. Dale, *et al.* *Farmacologia*. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan. 2001. 692 p.
- Rangaswani, S. e E. Venkata. *Proc. Indian. Acad. Sci*, v.52, p.173. 1960.
- Rapoport, R. M. e F. Murad. Agonist-induced endothelium-dependent relaxation in rat theic aorta may be mediated through cGMP. *Circ Res*, v.52, n.3, Mar, p.352-7. 1983.
- Rattmann, Y. D., M. R. Terluk, *et al.* Effects of alkaloids of *Himatanthus lancifolius* (Muell. Arg.) Woodson, Apocynaceae, on smooth muscle responsiveness. *J Ethnopharmacol*, v.100, n.3, Sep 14, p.268-75. 2005.
- Record, S. J. e R. W. Hess. *Timbers of the New World*. New Haven: Yale University Press. 1949
- Ribeiro, R. *Avaliação da capacidade antineoplásica in vitro de duas espécies medicinais da Amazônia: Himatanthus sucuuba e Arrabidaea chica*. XV Simpósio de Plantas Medicinais Brasileiras. Água de Lindóia: Anais do XV Simpósio de Plantas Medicinais Brasileiras 1998. p.
- Robbers, J. E., M. K. Speedle, *et al.* *Pharmacognosy and Pharmacobinotechnology*. Baltimore: Williams & Wilkins. 1996. 337 p.
- Salvemini, D., Z. Q. Wang, *et al.* Nitric oxide: a key mediator in the early and late phase of carrageenan-induced rat paw inflammation. *Br J Pharmacol*, v.118, n.4, Jun, p.829-38. 1996.
- Sangster, A. W. e K. L. Stuart. Ultraviolet spectra of Alkaloids. *Chemical Reviews*, v.65, p.69-130. 1965.
- Santos Junior, J. Rubor, calor, tumor e dor e o paciente grave. *Revista brasileira de coloproctologia*, v.23, n.3, p.206-210. 2003.
- Santos, R. A. D. *Farmacopeia Brasileira I*. São Paulo: Companhia Editora Nacional, v.1. 1926. p.1017 p.
- Sass, P. M. The involvement of selectins in cell adhesion, tumor progression, and metastasis. *Cancer Invest*, v.16, n.5, p.322-8. 1998.
- Sauer, G., H. Deissler, *et al.* New molecular targets of breast cancer therapy. *Strahlenther Onkol*, v.178, n.3, Mar, p.123-33. 2002.

- Schleimer, R. P. Effects of glucocorticosteroids on inflammatory cells relevant to their therapeutic applications in asthma. *Am Rev Respir Dis*, v.141, n.2 Pt 2, Feb, p.S59-69. 1990.
- Schmid, H., H. Bickel, *et al.* Organische und biologische Chemie Zur Kenntnis des Plumierids. . *Helvetica Chimica Acta*, v.35, p.415. 1952.
- Schmidt, H. H. e U. Walter. NO at work. *Cell*, v.78, n.6, Sep 23, p.919-25. 1994.
- Schmidt, J. L. N. T., N. H. Khoi, *et al.* *Phytochemistry*, v.22, p.1032. 1983.
- Schmuz, J., F. Hunzicher, *et al.*, v.40, p.1189. 1957.
- Schripsema, J., D. Dagnino, *et al.* *Alcalóides indólicos*, Porto Alegre/Florianópolis.: Editora da Universidade UFRGS/Editora da UFSC. 1999
- Sedgwick, R. e D. Willoughby. Initiation of the inflammatory response and its prevention. In: (Ed.). *Handbook of inflammation* (ed. by Bonta, IL; Bray, MA & Parnham, MJ), New York: Elsevier, 1985. Initiation of the inflammatory response and its prevention, p.27-47
- Shapira, S., T. Kadar, *et al.* Dose-dependent effect of nitric oxide synthase inhibition following transient forebrain ischemia in gerbils. *Brain Res*, v.668, n.1-2, Dec 30, p.80-4. 1994.
- Shen, Y. C., C. J. Chou, *et al.* Anti-inflammatory effects of the partially purified extract of radix *Stephaniae tetrandrae*: comparative studies of its active principles tetrandrine and fangchinoline on human polymorphonuclear leukocyte functions. *Mol Pharmacol*, v.60, n.5, Nov, p.1083-90. 2001.
- Siddiqui, B. S. e F. S. Begum. Two triterpenoids from the leaves of *Plumeria obtusa*. *Phytochemistry*, v.52, 4 may 1999, p.1111-1115. 1999.
- Siddiqui, B. S., A. Naeed, *et al.* Minor iridoids from leaves of *Plumeria obtusa*. *Phytochemistry*, v.37, n.3, p.769-771. 1994.
- Silva, J. R. A. *Atividades citotóxica seletiva do látex de Himatanthus sukuuba (Spruce) Woodson*. XV Simpósio de Plantas Médicas Brasileiras. Água de Lindóia: Anais, 1998a. p.
- Silva, J. R. A., *et al.*. *Composição e atividades antiinflamatória e analgésica do látex de Himatanthus sukuuba (Spruce) Woodson*. XV Simpósio de Plantas Médicas Brasileiras. Água de Lindóia, 1998b. p.
- Silva, J. R. A., C. M. Resende, *et al.* Esteres triterpênicos de *Himatanthus sukuuba (Spruce) Woodson*. *Química Nova*, v.21, p.702-704. 1998.
- Silva, M. *Brief history of inflammation*. In: *Handbook of experimental pharmacology* (ed. by Vane, JR & Ferreira, SH. New York: Springer Verlag, v.1. 1978. 6-25 p.
- Simchowit, L. e I. Spilberg. Chemotactic factor-induced generation of superoxide radicals by human neutrophils: evidence for the role of sodium. *J Immunol*, v.123, n.5, Nov, p.2428-35. 1979.



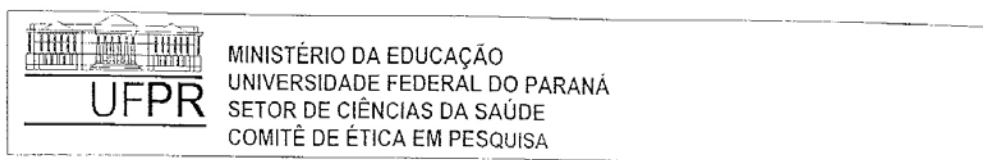
- Smith, C. W., J. C. Hollers, *et al.* Motility and adhesiveness in human neutrophils. Effects of chemotactic factors. *J Clin Invest*, v.63, n.2, Feb, p.221-9. 1979.
- Snyder, S. H. e D. S. Bredt. Biological roles of nitric oxide. *Sci Am*, v.266, n.5, May, p.68-71, 74-7. 1992.
- Soejarto, D. D. Biodiversity prospecting and benefit-sharing: perspectives from the field. *J Ethnopharmacol*, v.51, n.1-3, Apr, p.1-15. 1996.
- Sohrab, M. H., R. Chowdhury, *et al.* Antibacterial activity and cytotoxicity of extractives from *Ravenia spectabilis*. *Fitoterapia*, v.75, n.5, Jul, p.510-3. 2004.
- Solymosy, M., Z. Nagy, *et al.* Interaction of casein with human polymorphonuclear cells. *Biochem Med Metab Biol*, v.35, n.3, Jun, p.293-301. 1986.
- Souza, C. P., M. L. L. Azevedo, *et al.* Molluscicidal activity of natural products. *Ana Acad Brasil Science*, v.56, p.333-338. 1984.
- Souza, W. M., A. E. Stinghen, *et al.* Antimicrobial activity of alkaloidal fraction from barks of *Himatanthus lancifolius*. *Fitoterapia*, v.75, n.7-8, Dec, p.750-3. 2004.
- Springer, T. A. Traffic signals for lymphocyte recirculation and leukocyte emigration: the multistep paradigm. *Cell*, v.76, n.2, Jan 28, p.301-14. 1994.
- Springer, T.A. Traffic signals on endothelium for lymphocyte recirculation and leukocyte emigration. *Annu Rev Physiol*, v.57, p.827-72. 1995.
- Syrigos, K. N., K. J. Harrington, *et al.* Role of adhesion molecules in bladder cancer: an important part of the jigsaw. *Urology*, v.53, n.2, Feb, p.428-34. 1999.
- Tan, G. T., J. M. Pezzuto, *et al.* Evaluation of natural products as inhibitors of human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) reverse transcriptase. *J Nat Prod*, v.54, n.1, Jan-Feb, p.143-54. 1991.
- Thelen, M., B. Dewald, *et al.* Neutrophil signal transduction and activation of the respiratory burst. *Physiol Rev*, v.73, n.4, Oct, p.797-821. 1993.
- Toledo, V. M. *New paradigms for a new ethnobotany: reflections on the case of Mexico*. Oregon: Dioscorides. 1997
- Tracey, K. J. The inflammatory reflex. *Nature*, v.420, n.6917, Dec 19-26, p.853-9. 2002.
- Van Beek, T. A. *Pharmacognostical studies of some Tabernaemontana species*. Leiden: Leiden University. 1984. 164 p.
- Van Den Berg, M. E. *Plantas medicinais na Amazônia: Contribuição ao seu conhecimento Sistemático*. Belém: CNPQ/PRU/MPEG. 1982. 212 p.

- Van Der Berg, M. A. *Ethnobotany in the Neotropics. Advances in Economic Botany*. New York: New York Botanical Gardens. 1984. 140-149 p.
- Vanderlei, M. F., M. S. Silva, *et al.* Iridoids and Triterpenes from *Himatanthus phagedaenica*: The complete Assignment of the <sup>1</sup>H and <sup>13</sup>C RNM Spectra of Two Iridoid Glycosides. *J. Braz. Chem. Soc.*, v.2, n.51. 1991.
- Vanderlei, M. F. e R. M. Souza Brito. Ações espasmognicas do extrato etanólico bruto de *Himatanthus phagedaenica* (MART.) Woodson, em ileo isolado de cobaia. *Revista Brasileira de Farmacia*, v.70, n.1, p.15-18. 1989.
- Vasta, V., E. Meacci, *et al.* Identification of a specific transport system for L-arginine in human platelets. *Biochem Biophys Res Commun*, v.206, n.3, Jan 26, p.878-84. 1995.
- Veloso, M. P., T. J. Nagem, *et al.* b-dihidroplumericinec acid from *Himatanthus phagedaenicus*. *Biochemical Systematics and Ecology*, v.27, p.669-671. 1999.
- Verpoorte, R. e J. Schiripsema. *Rapid identification of trace amounts of indole alkaloids: analysis of the aromatic pattern from the H-RNM spectrum*. Amsterdam: Elsevier Science Publishers, v.9. 1991
- Vicente, C. A. *Biodiversidad y plantas medicinales*. Buenos Aires: Cetaar. 1994
- Villegas, L. F., I. D. Fernandez, *et al.* Evaluation of the wound-healing activity of selected traditional medicinal plants from Peru. *J Ethnopharmacol*, v.55, n.3, Feb, p.193-200. 1997.
- Vinegar, R., J. F. Truax, *et al.* Quantitative studies of the pathway to acute carrageenan inflammation. *Fed Proc*, v.35, n.13, Nov, p.2447-56. 1976.
- Von Andrian, U. H. e C. R. Mackay. T-cell function and migration. Two sides of the same coin. *N Engl J Med*, v.343, n.14, Oct 5, p.1020-34. 2000.
- Wang, F., Y. Cao, *et al.* Anti-invasion and anti-angiogenesis effect of taxol and camptothecin on melanoma cells. *J Asian Nat Prod Res*, v.5, n.2, Jun, p.121-9. 2003.
- Wani, M. C., H. L. Taylor, *et al.* Plant antitumor agents. VI. The isolation and structure of taxol, a novel antileukemic and antitumor agent from *Taxus brevifolia*. *J Am Chem Soc*, v.93, n.9, May 5, p.2325-7. 1971.
- Wennmalm, A. Endothelial nitric oxide and cardiovascular disease. *J Intern Med*, v.235, n.4, Apr, p.317-27. 1994.
- Wilkinson, P. C. Assays of leukocyte locomotion and chemotaxis. *J Immunol Methods*, v.216, n.1-2, Jul 1, p.139-53. 1998.
- Williams, D. H. e I. Fleming. *Spectroscopy methods in organic chemistry*. London: McGraw. 1987. 246 p.

- Wink, M. *Physiology of secondary product formation in plants. In: Charlwood, BV; Rhodes, MJC. Secondary products from plant tissue culture.* Oxford: Clarendon. 1990
- Wolfrom, M. L. e A. Thompson. *Meth. Carbohydr. Chem.*, v.2, p.65-68. 1963.
- Wolin, M. S. Interactions of oxidants with vascular signaling systems. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, v.20, n.6, Jun, p.1430-42. 2000.
- Wong, G. K. e P. A. Marsden. Nitric oxide synthases: regulation in disease. *Nephrol Dial Transplant*, v.11, n.1, Jan, p.215-20. 1996.
- Woodson, R. E. Studies in the Apocynaceae. An interim Revision of the Genus *Aspidosperma* Mart. et Zucc. *Annals of the Missouri Botanical Garden*, v.25, p.200. 1951.
- Wu, G. e S. M. Morris, Jr. Arginine metabolism: nitric oxide and beyond. *Biochem J*, v.336 ( Pt 1), Nov 15, p.1-17. 1998.
- Xu, H., J. A. Gonzalo, *et al.* Leukocytosis and resistance to septic shock in intercellular adhesion molecule 1-deficient mice. *J Exp Med*, v.180, n.1, Jul 1, p.95-109. 1994.
- Yamada, K. M. e D. W. Kennedy. Dualistic nature of adhesive protein function: fibronectin and its biologically active peptide fragments can autoinhibit fibronectin function. *J Cell Biol*, v.99, n.1 Pt 1, Jul, p.29-36. 1984.
- Yamaguchi, M., K. Hirai, *et al.* Dexamethasone inhibits basophil migration. *Allergy*, v.49, n.5, May, p.371-5. 1994.
- Yoshida, M., M. Fuchigami, *et al.* Antiproliferative constituents from Umbelliferae plants VII. Active triterpenes and rosmarinic acid from *Centella asiatica*. *Biol Pharm Bull*, v.28, n.1, Jan, p.173-5. 2005.
- Yuzurihara, M., Y. Ikarashi, *et al.* Geissoschizine methyl ether, an indole alkaloid extracted from *Uncariae Ramulus* et *Uncus*, is a potent vasorelaxant of isolated rat aorta. *Eur J Pharmacol*, v.444, n.3, May 31, p.183-9. 2002.
- Zentay, Z., M. Sharaf, *et al.* Mechanism for dexamethasone inhibition of neutrophil migration upon exposure to lipopolysaccharide *in vitro*: role of neutrophil interleukin-8 release. *Pediatr Res*, v.46, n.4, Oct, p.406-10. 1999.
- Zigmond, S. H. Ability of polymorphonuclear leukocytes to orient in gradients of chemotactic factors. *J Cell Biol*, v.75, n.2 Pt 1, Nov, p.606-16. 1977.

## ANEXO I

---



Curitiba, 28 de abril de 2.004.

Ilmo (a) Sr. (a)  
**ALMERIANE MARIA WEFFORT SANTOS**  
Nesta

Prezado(a) Senhor(a):

Comunicamos que o Projeto de Pesquisa intitulado "ESTUDO *IN VITRO* DA ATIVIDADE BIOLÓGICA DE COMPOSTOS ISOLADOS OU DERIVADOS DE PLANTAS MEDICINAIS", está de acordo com as normas éticas estabelecidas pela Resolução nº 196/96 do Ministério da Saúde, foi analisado e aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa do Setor de Ciências da Saúde da UFPR em reunião do dia 28 de abril de 2.004.

Registro CEP/SD: 039.SI.003/04-01

Sendo o que se apresenta para o momento, subscrevo-me,

Atenciosamente

*Miguel A. Hanna*  
Prof. Dr. Miguel Ibraim A. Hanna Sobrinho  
Coordenador do Comitê de Ética em  
Pesquisa do Setor de Ciências da Saúde

Endereço: Rua Padre Camargo, 280 – Alto da Glória – Curitiba-Pr. – C EP: 80060-240  
Fone/fax: 41-360-7259 – e-mail: cometica@saude.ufpr.br

## ANEXO II

---

### ***TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO***

- a) A proposta desse projeto é estabelecer um painel de ensaios biológicos *in vitro*, que possam, de forma dinâmica, demonstrar a atividade antiinflamatória de constituintes de plantas medicinais tradicionalmente utilizadas pela população em processos inflamatórios e, simultaneamente, contribuir para a elucidação dos mecanismos celulares e moleculares envolvidos.
- b) Caso você participe da pesquisa, uma quantidade de sangue será destinada a separação de leucócitos para utilização nos ensaios de migração leucocitária.
- c) Para doadores voluntários, como em qualquer outro diagnóstico clínico laboratorial, poderão ocorrer alguns desconfortos, principalmente relacionados à coleta de sangue por punção venosa.
- d) Estão garantidas todas as informações pertinentes ao projeto, antes, durante e depois do estudo.
- e) A sua participação nesse estudo é voluntária. Você tem a liberdade de recusar a participar nesse estudo, ou se aceitar, poderá retirar seu consentimento a qualquer momento que desejar.
- f) Se qualquer informação relacionada ao estudo for divulgada em relatório ou publicação, isso será feito sob forma codificada, para que a confidencialidade do doador seja mantida.
- g) Todas as despesas decorrentes da realização da pesquisa **NÃO** são da responsabilidade do doador.
- h) Pela sua participação no estudo, você **NÃO** receberá qualquer valor em dinheiro.
- i) Quando os resultados forem publicados, não aparecerá seu nome e sim um código.
- j) Todos os itens desse termo estão de acordo com a resolução CNS 196/96.

Eu, \_\_\_\_\_ li o texto acima e compreendi a natureza e objetivo do estudo do qual fui convidado a participar. Eu entendi que sou livre para interromper minha participação no estudo a qualquer momento sem justificar minha decisão e concordo voluntariamente em participar desse estudo.

\_\_\_\_\_  
Assinatura do doador

\_\_\_\_\_/\_\_\_\_\_/\_\_\_\_\_  
data

\_\_\_\_\_  
Assinatura do pesquisador

## ARTICLE IN PRESS



ELSEVIER

Fitoterapia xx (2004) xxx–xxx

FITOTERAPIA

www.elsevier.com/locate/fitote

## Short Report

Antimicrobial activity of alkaloidal fraction from  
barks of *Himatanthus lancifolius*

W.M. Souza, A.E.M. Stinghen, C.A.M. Santos\*

*Laboratory of Pharmacognosy, Department of Pharmacy, Universidade Federal do Paraná,  
Rua Prof. Lothario Meissner, 3400, Jardim Botânico, 80210-070 Curitiba, Brazil*

Received 25 June 2003; accepted in revised form 3 September 2004

## Abstract

The alkaloidal fraction from *Himatanthus lancifolius* barks demonstrated a broad-spectrum in vitro antimicrobial activity for most of the Gram (+) and Gram (–) tested microorganisms.  
© 2004 Elsevier B.V. All rights reserved.

**Keywords:** *Himatanthus lancifolius*; Indole alkaloids; Antimicrobial activity

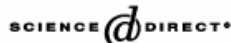
## 1. Plant

*Himatanthus lancifolius* (Müell. Arg) Woodson (Apocynaceae), stem barks commercially acquired in the surroundings areas of São Paulo, Brazil in February 2003. It was identified according to description of Brazilian Pharmacopoeia I [1] and by macro- and microscopically comparison with authentic sample at the Laboratory of Pharmacognosy, Department of Pharmacy, Federal University of Paraná, Curitiba, PR. A voucher specimen was deposited in the Herbarium of the laboratory.

\* Corresponding author. Tel./fax: +55 41 3604062.

E-mail address: cid@ufpr.br (C.A.M. Santos).



Available online at [www.sciencedirect.com](http://www.sciencedirect.com)

Journal of Ethnopharmacology xxx (2005) xxx–xxx

[www.elsevier.com/locate/jethpharm](http://www.elsevier.com/locate/jethpharm)

## Effects of alkaloids of *Himatanthus lancifolius* (Muell. Arg.) Woodson, Apocynaceae, on smooth muscle responsiveness

Yanna D. Rattmann<sup>a</sup>, Márcia R. Terluk<sup>a</sup>, Wesley M. Souza<sup>b</sup>, Cid A.M. Santos<sup>b</sup>,  
Maique W. Biavatti<sup>c</sup>, Luce B. Torres<sup>d</sup>, Sonia Mesia-Vela<sup>a</sup>, Lia Rieck<sup>a</sup>,  
José E. da Silva-Santos<sup>e,\*</sup>, Maria C. de A. Marques<sup>a</sup>

<sup>a</sup> Department of Pharmacology, Biological Sciences Sector, Health Sciences Sector, Universidade Federal de Paraná, Curitiba, Brazil<sup>b</sup> Department of Pharmacy, Health Sciences Sector, Universidade Federal de Paraná, Curitiba, Brazil<sup>c</sup> Universidade do Vale do Itajaí, Itajaí, Brazil<sup>d</sup> Department of Physiology, Institute of Botany, São Paulo, SP, Brazil<sup>e</sup> Laboratory of Pharmacology, Department of Pharmacy, Universidade da Região de Joinville, Bom Retiro, CEP 89223-251, Joinville, SC, Brazil

Received 13 January 2005; received in revised form 13 February 2005; accepted 17 February 2005

### Abstract

*Himatanthus lancifolius*, popularly known as “agoniada” in Brazil, is largely used in folk medicine against asthma, dysmenorrhea and as an emenagogue and abortive. This study reveals the effects of an alkaloid rich fraction (AlkF) obtained from the bark of *Himatanthus lancifolius* in vascular and non-vascular smooth muscle responsiveness. Incubation of AlkF (3–30 µg/ml) during 15 min generates a concentration-related and fully reversible reduction in maximal contractile responses evoked by acetylcholine and phenylephrine in rat jejunum and aorta preparations, respectively. Exposition of endothelium-denuded pre-contracted rat aorta rings to AlkF results in a complete relaxation, with EC<sub>50</sub> of 22.2 (16.2–28.2 µg/ml). AlkF is also able to induce a concentration-related rightward shift of cumulative concentration curves for calcium in uterus and aorta rings maintained in depolarizing nutritive solution. Moreover, addition of AlkF in calcium-free solution also reduces, in a concentration-dependent manner, the ability of caffeine and phenylephrine to contract aorta rings. This study reveals that the bark of *Himatanthus lancifolius* possesses one or more indole alkaloids able to alter non-vascular and vascular smooth muscle responsiveness, an event that may involve the blocking of calcium entry or changes on intracellular calcium utilization or mobilization.

© 2005 Elsevier Ireland Ltd. All rights reserved.

**Keywords:** Alkaloids; Smooth muscle; Calcium; *Himatanthus lancifolius*; Apocynaceae; Aorta

### 1. Introduction

*Himatanthus lancifolius* (Muell. Arg.) Woodson (Apocynaceae) formerly known as *Plumeria lancifolia*, is popularly called “agoniada” in Brazil. The dried stem bark of this specie is commonly used as a febrifuge, as an emenagogue and as an abortive (Coimbra, 1994). *Himatanthus lancifolius* is an official plant of the Brazilian Pharmacopeia I (1929) and forms part of the composition of commercial products indicated in

the treatment of dysmenorrhea and in the amelioration of menopausal symptoms.

*Himatanthus lancifolius*, like other *Himatanthus* species, has scarcely been mentioned in the scientific literature regarding its biological activities. Among the members of this genus, some species are reported to present molluscicidal activity (e.g. see Perdue and Blomster, 1978), and anti-inflammatory and analgesic properties (de Miranda et al., 2000). In addition, bioactivity-guided fractionation of the hexane extract of *Himatanthus sucuba* bark led to the isolation of iridoids plumericin and isoplumericin, described as both potent antimicrobial agents against *Cladosporium sphaerospermum* (Silva et al., 1998)

\* Corresponding author. Tel.: +55 47 461 9091; fax: +55 47 473 0131.

E-mail address: [jesilvasantos@ufpr.br](mailto:jesilvasantos@ufpr.br) (J.E. da Silva-Santos).

Cristiane Hatsuko Baggio<sup>1</sup>  
 Gláucia De Martini Otofui<sup>1</sup>  
 Wesley Mauricio de Souza<sup>2</sup>  
 Cid Aimbiré de Moraes Santos<sup>2</sup>  
 Lúcia Maria Brandão Torres<sup>3</sup>  
 Lia Rieck<sup>1</sup>  
 Maria Consuelo de Andrade Marques<sup>1</sup>  
 Sonia Mesia-Vela<sup>1</sup>

## Gastroprotective Mechanisms of Indole Alkaloids from *Himatanthus lancifolius*

Original Paper

### Abstract

The indole alkaloids mixture (AlkF) obtained from the barks of *Himatanthus lancifolius* (Muell. Arg.) Woodson was evaluated for gastroprotective properties in rodents. The AlkF potently protected rats from experimentally induced gastric lesions by ethanol (ED<sub>50</sub> = 30 mg/kg, *p.o.*) and reduced gastric acid hypersecretion induced by pylorus ligation (ED<sub>50</sub> = 82 mg/kg, *i.d.*). Protective effects of the AlkF in the ethanol and hypersecretion models included increase of GSH levels of gastric mucosa indicating activation of GSH-dependent cytoprotective mechanisms. Also, an increase of the antioxidant capacity as measured through glutathione *S*-transferase activity was observed in the hypersecretory but not in the ulcerative model. Furthermore, the amount of nitric oxide derivatives (NO<sub>2</sub> + NO<sub>3</sub>) in the forestomach was increased while the amount released into the gastric juice during pylorus ligation was decreased by the AlkF suggesting an alteration of NO-

related mechanisms. Reduction of gastric acid hypersecretion induced by pylorus ligation seems to correlate with the blockade of H<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>-ATPase activity as determined *in vitro* by the capacity of the AlkF mix to decrease the hydrolysis of ATP by the ATPase isolated from dog gastric mucosa (EC<sub>50</sub> = 212 µg/mL). Cholinergic mechanisms can be excluded since intestinal transit was not modified with doses up to 100 mg/kg (*p.o.*). GC-MS investigation of components of the AlkF resulted in the identification of 3 main indole alkaloids, uleine (53%), its isomer (13%), demethoxyaspidormine (23.8%) and traces of at least other five alkaloids. Collectively, the results show the novel gastroprotective properties of the indole AlkF of *H. lancifolius* through a variety of mechanisms.

### Key words

Alkaloids · uleine · demethoxyaspidormine · antiulcer · medicinal plant · *Himatanthus*

733

### Introduction

*Himatanthus lancifolius* (Apocynaceae), like many other *Himatanthus* species, is used in South American folk medicine to treat malaria, snakebites, tumors, arthritis, gastritis, and other ailments [1]. Some *Himatanthus* are reportedly molluscicidal, spasmolytic and potential anti-inflammatory drugs as experimentally determined [2], [3], [4], [5], [6]. The presence of lupeol acetate,  $\alpha$ -amyrin and lupeol cinnamates and the iridoids plu-

mericin and isoplumericin correlated with those activities. For *H. lancifolius*, no biological activity has been so far reported although its chemistry is rich in indole alkaloids such as uleine and demethoxyaspidospermine [7] as has been previously determined. The aim of the present study was to assess the gastroprotective potential of the indole alkaloid-rich fraction separated from the barks of *H. lancifolius* using *in vivo* and *in vitro* experimentation.

### Affiliation

<sup>1</sup> Department of Pharmacology, Biological Sciences Sector, Universidade Federal of Paraná, Curitiba, Brazil

<sup>2</sup> Department of Pharmacognosy, Health Sciences Sector, Universidade Federal of Paraná, Curitiba, Brazil

<sup>3</sup> Department of Physiology, Institute of Botany, São Paulo, SP, Brazil

### Correspondence

Sonia Mesia-Vela, Ph.D. · Department of Pharmacology · Biological Sciences Sector · Universidade Federal of Paraná · UPR - Centro Politécnico · Caixa Postal 19031 · Jardim das Américas · CEP 815 31-990 · Curitiba-PR · Brazil · Phone: +55-41-361-1721 · Fax: +55-41-266-2042 · E-mail: sm2418@columbia.edu

Received October 11, 2004 · Accepted April 22, 2005

### Bibliography

Planta Med 2005; 71: 733-738 · © Georg Thieme Verlag KG Stuttgart · New York  
 DOI 10.1055/s-2005-871286 · Published online August 11, 2005  
 ISSN 0032-0943

#### HC001 - EFFECTS OF ULEINE ON LEUKOCYTE CHEMOTAXIS

WESLEY MAURICIO DE SOUZA(PG)<sup>(1)</sup>; CID AIMBIRÉ DE MORAES SANTOS(PQ)<sup>(1)</sup>; ALMERIANE MARIA WEFFORT-SANTOS(PQ)<sup>(1)</sup>

<sup>(1)</sup>Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas–UFPR–Curitiba,Brazil

**INTRODUCTION/OBJECTIVE:**The effects of uleine isolated from *Himatanthus lancifolius* (Muell. Arg.) Woodson barks in leukocyte chemotaxis induced by casein was investigated using the Boyden chamber. **METHOD:**Peripheral blood leukocytes harvested from volunteers were treated with uleine ( $10^{-9}$ – $10^{-6}$  µg/ml) for 30min at 37°C, and induced to migrate towards casein gradient. Dexamethasone ( $10^{-5}$ M) was used as a negative control. **RESULTS:**Uleine inhibited significantly the casein-induced migration of leukocytes in a dose-dependent fashion. The highest effect was at  $10^{-6}$  µg/ml, with only  $50.1 \pm 5.8\%$  ( $n=7$ ;  $p<0.05$ ) of the treated-cells recovered from the lower chamber; for dexamethasone-treated cells, the values were  $68.6 \pm 11.8\%$  ( $n=8$ ). These effects were not resultant of uleine toxicity as cell viability estimated by the trypan blue test was always  $>94\%$ . Also, uleine showed no chemoattractant activity itself. Of particular interest were the results observed after pre-treating the cells with morphine ( $10^{-6}$ M) and naloxone ( $10^{-6}$ M) before migration, in which such effect could be blocked. **CONCLUSIONS:**These data suggest that the uleine effects may be mediated through opioid receptors, and supports the anti-inflammatory effects of *H. lancifolius*.

Financial support: CNPq  
Supervisor: Cid A.Santos



## Ação da uleína sobre a produção de óxido nítrico em células RAEC e B16F10

Wesley M. Souza<sup>1</sup>, Fabrício Brehmer<sup>1</sup>, Lia S. Nakao<sup>2</sup>, Andréa E. M. Stingen<sup>2</sup>,  
Cid A. M. Santos<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Laboratório de Farmacognosia, Universidade Federal do Paraná, 80210-170, Curitiba, PR, Brasil,

<sup>2</sup>Pós-Graduação em Ciências da Saúde, Pontifícia Universidade Católica do Paraná, 80215-901, Curitiba, PR, Brasil

**RESUMO:** Foi investigada a influência da fração rica em alcalóides e da substância majoritária desta fração, uleína, isolada das cascas de *Himatanthus lancifolius* (Muell. Arg.) Woodson, Apocynaceae, popularmente conhecida como agoniada, sobre a produção de óxido nítrico em células RAEC e B16F10 e a correlação com a atividade antioxidante. Os ensaios de atividade antioxidante foram realizados utilizando os métodos de redução do complexo fosfomolibdênico e o da redução do radical livre DPPH. Os resultados demonstraram uma atividade antioxidante de  $59,3 \pm 0,8\%$  para a fração alcaloídica, enquanto que, para a uleína, esse efeito foi de  $0,5 \pm 0,1\%$  no ensaio de redução do complexo fosfomolibdênico. No ensaio do DPPH, a fração alcaloídica apresentou  $IC_{50} = 196,3 \pm 8,9 \mu\text{g/mL}$  e para a uleína  $6475,0 \pm 25,0 \mu\text{g/mL}$ . A uleína, principal alcalóide da fração, estimulou uma produção máxima de óxido nítrico nas concentrações de  $0,1 \mu\text{g/mL}$  ( $20,9 \pm 1,4 \mu\text{M}$ ) e  $1 \mu\text{g/mL}$  ( $41,1 \pm 0,2 \mu\text{M}$ ) utilizando células RAEC e B16F10, respectivamente, demonstrando que o efeito da uleína nas células ocorre através de estímulos nas vias de produção de óxido nítrico e não por um efeito sequestrante de radical livre.

**Unitermos:** *Himatanthus lancifolius*, Apocynaceae, agoniada, antioxidante, óxido nítrico, uleína.

**ABSTRACT:** "Uleine effect on the production of nitric oxide in RAEC and B16F10 cells". The influence of the rich alkaloidal fraction and of the major substance in this fraction, uleine, isolated from the barks of *Himatanthus lancifolius* (Muell. Arg.) Woodson, Apocynaceae, popularly known as agoniada, on the nitric oxide production in RAEC and B16F10 cells and its correlation with the antioxidant activity, were investigated. For the antioxidant activity the methods of formation of a phosphomolybdenum complex and the reduction of the free radical DPPH were used. The results demonstrated an antioxidant activity of  $59.3 \pm 0.8\%$  for the alkaloidal fraction, while for uleine the effect was of  $0.5 \pm 0.1\%$  in the reduction of the phosphomolybdenum method. In the assay of DPPH, the alkaloidal fraction presented  $IC_{50} = 196.3 \pm 8.9 \mu\text{g/mL}$  and for uleine,  $6475.0 \pm 25.0 \mu\text{g/mL}$ . Uleine also stimulated a maximum nitric oxide production in the concentrations of  $0.1 \mu\text{g/mL}$  ( $20.9 \pm 1.4 \mu\text{M}$ ) and  $1 \mu\text{g/mL}$  ( $41.1 \pm 0.2 \mu\text{M}$ ) using RAEC and B16F10 cells, respectively, demonstrating that the effect of uleine in the cells occurs by promoting the nitric oxide production pathway, but not through a free radical scavenger effect.

**Keywords:** *Himatanthus lancifolius*, Apocynaceae, agoniada, antioxidant, uleine.

## INTRODUÇÃO

A família Apocynaceae possui cerca de 200 gêneros e 2000 espécies, de distribuição tropical e subtropical, podendo chegar até regiões temperadas. O gênero *Himatanthus* foi descrito por Willdenow (Woodson, 1951) e consiste de árvores, arbustos ou subarbustos. *Himatanthus lancifolius* (Muell. Arg.) Woodson, Apocynaceae, previamente denominada *Plumeria lancifolia* Muell. Arg., popularmente conhecida como agoniada, é uma planta nativa que cresce em diferentes áreas do Brasil, particularmente nos estados de Minas Gerais, Espírito Santo, Rio Grande do Sul, Goiás

e Amazônia, sendo descrita oficialmente na Farmacopéia Brasileira I (Brandão et al., 2006). São indicadas na medicina tradicional para o tratamento de várias doenças de pele, febrifuga, emenagoga, purgativa, anti-úlceras, asma, sífilis e principalmente como estimulante das contrações uterinas, auxiliando na concepção e regularizando a menstruação (Corrêa et al., 1998).

Estudos com os extratos das cascas dessa planta demonstraram preliminarmente a presença de uleína (1) e (+)-demetoxiaspidospermina (França et al., 2000). A fração de alcalóides, rica em uleína, também apresentou atividade gastroprotetora (Baggio et al., 2005) e efeitos sobre a resposta em musculatura lisa vascular e não-

\* E-mail: cid@ufpr.br; Tel./Fax +55-41-33604062

Submetido à Fitoterapia  
Short Report

Preliminary evaluation of uleine in cellular adhesion of B16F-10  
melanoma cells and its antimicrobial activity

W. M. Souza<sup>a</sup>, J. Getz<sup>b</sup>, L. Yared<sup>c</sup>, C. A. M. Santos<sup>a</sup>, L. S. Nakao<sup>b</sup>,

A. E. M. Stinghen<sup>b,c\*</sup>

<sup>a</sup>Laboratory of Pharmacognosy, Department of Pharmacy, Universidade Federal do Paraná, Rua Prof. Lothario Meissner, 3400, Jardim Botânico, 80210-070 Curitiba, Brazil

<sup>b</sup>Center for Advanced Molecular Investigation, Pontifícia Universidade Católica do Paraná, Rua Imaculada Conceição, 1155, Prado Velho, 80215-901 Curitiba, Brazil

<sup>c</sup>Centro Universitário Positivo, Núcleo de Ciências Biológicas e da saúde, Curso de Farmácia, Rua Prof. Pedro Viriato Parigot de Souza, 5300, 81280-330 Curitiba, Brazil

---

**Abstract**

Chemical investigations of an alkaloid extract from barks of *Himatanthus lancifolius* (Muell. Arg.) Woodson resulted in the isolation of uleine, an indole alkaloid. Its effect on the *in vitro* adhesion of murine melanoma cells (B16F-10) was tested. Results showed that increasing concentrations of uleine stimulated cellular adhesion. The maximum activity was observed at  $5 \times 10^{-4}$  µg/ml and this effect was mediated by uleine binding to adhesive proteins on the cell surface. Also, uleine showed a broad-spectrum *in vitro* antimicrobial activity for the gram (+) and gram (-) tested microorganisms.

**Keywords:** *Himatanthus lancifolius*; Indole alkaloid; Cellular adhesion; uleine; Antimicrobial activity

---

**1. Plant**

*Himatanthus lancifolius* (Müell. Arg) Woodson (Apocynaceae), formerly *Plumeria lancifolia*, was purchased from the surrounding areas of São Paulo, Brazil in February 2003, and was identified according to the Brazilian Pharmacopoeia I description [1] and by macro and microscopic comparisons with an authentic sample from the Pharmacognosy Laboratory in the Department of Pharmacy, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, Paraná, at which a voucher specimen was deposited.

\* Corresponding author. Tel/fax: +55-41-3317-3000.

E-mail address: [andreastinghen@unicenp.br](mailto:andreastinghen@unicenp.br) (A. E. M. Stinghen)